

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica  
**Číslo 3/2003**

**Standardní operační postupy  
pro biologické monitorování  
genotoxických účinků faktorů prostředí**

Duben 2003

Předseda redakční rady: doc. MUDr. L. Komárek, CSc.  
Členové: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika,  
RNDr. F. Rettich, CSc., A. Svobodová,  
Mgr. J. Veselá, MUDr. J. Volf, Ph.D.

Vydává Státní zdravotní ústav v Praze  
ISSN 0862-5956

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA  
Číslo 3/2003 - 1. vydání - duben 2003

**Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí**

Kolektiv autorů

Editor: Pavel Rössner, NRL pro genetickou toxikologii, SZÚ - Praha

Vytiskl: Ústav jaderných informací, Praha 5 - Zbraslav  
Elišky Přemyslovny 1335

Vychází nepravidelně 7-8x ročně  
Náklad 700 výtisků

Vydal Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, IČO 75010330

Tel. redakce: 267082288, e-mail: ahemszu@szu.cz

## Obsah

Úvod .....	4
<b>1. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů - Konvenční technika .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů - Fluorescenční in situ hybridizace s celochromozómovými sondami - FISH .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů - FPG technika, Výměny sesterských chromatid - SCE .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů - Mikronucleus test, Modifikace s cytochalasinem B .....</b>	<b>35</b>
<b>5. Alkalická jednobunková elektroforéza - Kométový test - SCGE .....</b>	<b>43</b>
<b>6. Amesův miskový test (plate incorporation essay) .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Mikrosuspenzní test dle Kado .....</b>	<b>70</b>
<b>8. Zpracování vzorků moče pro stanovení mutagenity pomocí Amesova miskového testu (plate incorporation assay) nebo pomocí mikrosuspenzního testu dle Kado .....</b>	<b>75</b>
<b>9. Příprava vzorku pitné vody pro testování jeho mutagenity pomocí Amesova miskového testu (plate incorporation assay) nebo pomocí mikrosuspenzního testu dle Kado .....</b>	<b>80</b>
<b>10. Příprava vzorku ovzduší (prachové částice PM10, PM2,5) pro testování jeho mutagenity pomocí Amesova miskového testu (plate incorporation assay) nebo pomocí mikrosuspenzního testu dle Kado .....</b>	<b>84</b>
<b>11. SOS Chromotest .....</b>	<b>90</b>
<b>12. Určení genotoxicity vody za použití umu-testu .....</b>	<b>103</b>
<b>13. Stanovení kreatininu ve vzorcích moči .....</b>	<b>117</b>
<b>14. Stanovení DNA aduktů polyaromatických látek metodou <sup>32</sup>P- postlabelingu DNA .....</b>	<b>121</b>
<b>15. Stanovení exprese proteinů p21<sup>waf1</sup> a p53 metodou ELISA .....</b>	<b>144</b>
<b>16. Měření koncentrace kotininu metodou RIA .....</b>	<b>156</b>
<b>17. Stanovení vitaminů A a E v krevní plazmě .....</b>	<b>163</b>
<b>18. Stanovení vitamínu C v krevní plazmě .....</b>	<b>172</b>
Příloha .....	178

## ÚVOD

Biologický monitoring představuje významný nástroj genetické toxikologie sloužící k určení expozice genotoxickým faktorům a k posouzení rizika pozdních následků pro exponované skupiny a jednotlivce. Je realizován pomocí standardizovaných metod umožňujících monitorování expozice populace prvkům a sloučeninám s toxickým či ochranným účinkem a detekcí mutagenní aktivity ovzduší a vody.

Pro biologické monitorování jsou využívány metody cytogenetické analýzy lidských periferních lymfocytů, kdy zejména molekulárně biologické techniky posunuly možnosti genetické toxikologie k detekci problematických typů aberací jako jsou translokace, inverse, inserce a aneuploidie. Vzhledem k úzkému vztahu procesu mutageneze a karcinogeneze opakované nálezy zvýšených hodnot chromozómových aberací u sledovaných osob upozorňují na riziko vyšší frekvence nádorových onemocnění. Z tohoto hlediska má uvedená metoda zásadní význam pro primární prevenci nádorových onemocnění, protože odráží výsledek sumární expozice populace vystavené směsí látek s proměnlivým kvalitativním i kvantitativním složením a velmi časně upozorňuje na jednotlivce s nevhodným metabolickým genotypem a/nebo s hypofunkčními ochrannými mechanismy (reparační systémy, imunitní reakce), které již nedokáží opravovat a kompenzovat genetická poškození vzniklá v důsledku expozice.

Analýza buněčných procesů kontrolujících buněčný cyklus a dělení buňky, kde jedním z klíčových kontrolních genů je gen řídící syntézu proteinu p53, je zaměřena na kontrolu integrity genomu.

Pro monitorování expozice je důležitá detekce kovalentních aduktů tvořených mezi chemickou látkou a buněčnými makromolekulami - např. DNA adukty, hemoglobinové a albuminové adukty, tvorba specifických aduktů s etylénem, propylénem, aromatickými aminy, aflatoxinem B1 apod. Jejich nález je spolehlivým důkazem expozice sledované látky a vzájemné interakce mezi xenobiotikem a biochemickými strukturami organismu.

V současné době je intenzivně studován problém odlišné vnímavosti jednotlivců i populačních (etnických) skupin ke vzniku nádorových onemocnění. Jedná se o genetickou predispozici ovlivňující vnímavost k expozici karcinogenním xenobiotikům. Odlišné polymorfismy enzymů metabolizujících karcinogeny tak ovlivňují frekvenci chromozómových aberací a výši karcinogenního rizika.

Tento soubor Standardních operačních postupů (SOP) je nabízen všem pracovištím, která se zabývají biologickým monitoringem i těm, kteří se ztotožňují s cílem dosáhnout co nejvyšší jednotnosti v laboratorních postupech vedoucí k vzájemně srovnatelným výsledkům a k objektivním interpretacím v rámci zemí bývalého Československa.

Soubor metodik vychází z Příloh AHEM č. 20/1989 a č. 5/2000. Metodiky používané aktualizuje, u ostatních (asociace satelitních chromosomů, stanovení merkapturátů v moči, stanovení peroxidace lipidů v plasmě) již skončila jejich praktická životnost a jsou nahrazovány jinými laboratorními postupy na základě nových teoretických poznatků. Předložený soubor metodik je otevřený systém, který bude podle potřeby doplňován a obměňován. Věřím, že se stane praktickou pomůckou pro většinu z nás.

MUDr. Pavel Rössner, CSc.  
vedoucí NRL pro genetickou  
toxikologii, SZÚ-Praha

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 340; 267 082 585; fax: 267 082 378;  
e-mail: hbavorova@szu.cz; ocadlikova@seznam.cz; rossner@szu.cz

## **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

### **1. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů Konvenční technika**

Původ metody: Hungerford, D. A. (1965) Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl Stain Technol. 40, 333-338.

Zpracoval: RNDr. Hana Bavorová, RNDr. Danuše Očadlíková

## **Výchozí zdroj:**

**Hungerford, D., A.:** (1965) Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Technol.* 40, 333 - 338

Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí - **Standardní metodika, Příloha AHEM č.20/1989**, 3-15

**Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.**(Změna: 208/2001 Sb.)

**OECD Guidelines For Chemicals**, 22<sup>nd</sup> January, 2001

### **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje detekci, kvalitativní a kvantitativní analýzu chromozómových abnormalit - strukturálních a numerických aberací - v savčích (lidských) buňkách *in vitro* pomocí optického mikroskopu.

### **2. Definice**

Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako chromozómové aberace, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

### **3. Princip metody**

Tento cytogenetický test *in vitro* je krátkodobý test pro detekci strukturálních a numerických aberací v kultivovaných savčích buňkách. Lze použít jak kultury stabilizovaných buněčných linií, tak primárních buněk, např. buňky čínského křečka nebo lidské lymfocyty. Po expozici testované látky s použitím i bez použití vhodného metabolického aktivačního systému se na buněčné kultury působí mitotickým jodem, např. kolchicinem, ke kumulaci dělicích se buněk (C-metafáze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a pak z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem a metafázické buňky analyzovány z hlediska chromozómových abnormalit.

### **4. Bezpečnost práce**

*Metodika vyžaduje práci s:*

- a) žiravinami (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- b) ostatními jedy (kolchicin)
- c) zvláště nebezpečnými jedy (metanol)
- d) karcinogeny a mutageny (např.: Thiotepa, cyklofosfamid, N-Nitrosodimethylamin)

Dodržování zásad běžných pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři, navíc kontakt s chemickými látkami typu mutagenů a karcinogenů.

Používání pomůcek osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky.

Dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami, s infekcí, včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie a spotřební materiál**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

### **Základní chemikálie**

Metanol, p.a.	Kulich, Hradec Králové
Kyselina octová, 99 %, p.a.	Penta Chrudim
Chlorid draselný, p.a.	Merck
Glutamin, 3 %, p.a.	Sevac
Colchicin pulv., reagent gr.	Calbiochem,US
Phytohaemagglutinin HA 15, reagent gr.	Murex , GB
Kyselý uhličitan sodný, 7.5 %, reagent gr.	Sevac
Thiotepa, 15 mg, injekce	Lederle, SRN
Cyklofosfamid, 200 mg, injekce	Orion, Finland
N-Nitrosodimethylamin, reagent gr.	Merck, USA
Deionizovaná voda	SZÚ, Millipore
Heparin 5 000 j., injekce	Spofa
Chromsírová směs	SZÚ

### **Kofaktory pro MAS (viz dále):**

NaDP	Serva
G-6-P	Reanal
MgCl <sub>2</sub>	Lachema
KCl	Lachema
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Lachema

### **Roztoky**

Médium pro kultivaci buněk RPMI 1640 - 5x konc. Sevac	uchovávat při 4 - 10 <sup>0</sup> C
Bovinní sérum pro TK	uchovávat při minim. - 20° C, po rozmražení spotřebovat do 1 měsíce
glutamin - 3 %	uchovávat při 4 - 10° C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
kyselý uhličitan sodný 7.5 %	uchovávat při 4 - 10°C otevřenou ampuli neuchovávat



PHA - HA 15	uchovávat při 4 - 10° C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
zásobní roztok kolchicinu	10 mg rozpustit v 10 ml fyziol. roztoku, uchovávat při 4 - 10° C do spotřebování
pracovní roztok kolchicinu	0,05 ml zásobního roztoku do 10 ml fyziol. roztoku, neuchovávat
0.55 % roztok chloridu draselného (hypotonizační roztok)	0,55 g KCl rozpustit ve 100 ml deionizované vody, při 37° C uchovávat do spotřebování
H <sub>2</sub> O: kys. octová: metanol (fixační roztok č. 1)	92 ml : 5 ml : 3 ml neuchovávat
metanol: kys. octová (fixační roztok č. 2)	3 díly : 1 dílu neuchovávat
Sörensenův pufr, pH 6.8 SZÚ	<i>roztok A:</i> 1,376 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> do 400 ml deionizované vody  <i>roztok B:</i> 5,52 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O do 600 ml deionizované vody roztoky slít a uchovávat při 4 - 10°C
5 % roztok Giemsa-Romanovski Merck	Giemsa.....5 ml Sörensenův pufr.....15 ml H <sub>2</sub> O deionizovaná... ..80 ml

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

### **Přístroje**

chladnička	(4 až 10°C )
mraznička	(od - 20°C )
centrifuga	(od 1 000 ot/min)
termostat	(37°C ± 10) - teplota kontrolována kalibrovaným teploměrem při provozu denně
třepačky	
mikroskopy	(vysoká rozlišovací schopnost při zvětšení 1.000 x ): Axiolab (Zeiss); Olympus BX 60 F; Olympus BX 40 F; Olympus CHS-G-CH-2; Amplival

## Pomocná zařízení

vodní vývěva  
automatické pipety  
laboratorní sklo a plast (kultivační lahve - Falcon, pipety atd.)  
plynové kahany  
germicidní zářivky  
analytické váhy

## 7. Pracovní postup

### *a) odběr krve*

- dezinfikovat loketní jamku Septonexem nebo Jodisolem
- do stříkačky s jehlou na jedno použití natáhnout cca 0.1 ml heparinu/1 ml krve nebo použít vakutainer s heparinem
- odebrat 1 ml krve (ev. podle potřeby více)
- jehlu na stříkačce krýt sterilním krytem a stříkačku s krví **ihned** několikrát převrátit, aby se dobře promíchala s heparinem
- stříkačku nebo vakutainer uložit do chladničky při teplotě 4° - 10°C

### **Pozor! Krev nesmí zmrznout.**

- pro každou osobu je vyplněna „Cytogenetická průvodka“, která je do laboratoře předána spolu s příslušnou krví a dále archivována.

### *b) transport krve*

je-li třeba krev transportovat z místa odběru do laboratoře, pak je třeba použít transportních chlazených termonádob, kde je krev po dobu mezi odběrem a předáním v laboratoři udržována při teplotě 4 - 10°C.

## Kultivace

### *Biologické monitorování*

Kultivace začíná do 24 hod po odběru krve, v mimořádných případech lze krev použít do 3 dnů po odběru. Kultivace probíhá v kultivačních nádobách v poměru 7,5 ml média a 0,6 ± 0,2 ml krve.

Kultivační médium pro 1 kulturu:	RPMI 1640	1,06 ml
	bovinní sérum	1,80 ml
	H <sub>2</sub> O	4,24 ml
	glutamin	0,10 ml
	NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	0,16 ml
	PHA HA 15	0,10 ml

Lahvičky musí být pevně uzavřeny a obsah dobře promíchán. Kultury se umístí do termostatu při teplotě  $37\pm 1^\circ\text{C}$  na 50 hod. Dvě hodiny před koncem kultivace se přidá 0,8 ml pracovního roztoku kolchicinu. Kultura se dobře promíchá a dále kultivuje.

### Testování látek

Lidské periferní lymfocyty jsou exponovány testované látce v přítomnosti i za absence metabolického aktivačního systému (MAS). MAS je připravován z S9 frakce jaterního homogenátu potkanů doplněného směsí kofaktorů.

Pro každý experimentální bod se použijí dvě kultury.

Jako **negativní kontrola** se použije:  
ředidlo (fyziol. roztok, DMSO)  
metabol. aktivační systém (MAS)  
ředidlo + MAS  
neovlivněná kultura

Jako **pozitivní kontrola** se použije: Thiotepa ( $10^{-6}$  M), přímý klastogen  
Cyklofosfamid ( $10^{-4}$  M), nepřímý klastogen s MAS a bez MAS

**Koncentrace látky:** použijí se nejméně tři koncentrace testované látky. Musí se lišit nejméně o jeden řád. Nejvyšší koncentrace musí inhibovat mitotickou aktivitu o 50%, nebo vykazovat jiné známky toxicity. Maximální koncentrace je 5 mg/ml.

**Doba expozice** musí pokrývat celý buněčný cyklus. Dobu kultivace je třeba volit tak, aby byly analyzovány pouze první mitózy (M 1). Pokud expozice nepokrývá celou dobu buněčného cyklu, je třeba volit různé doby kultivace, aby se kumulovaly buňky, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu. Testované látky se k buňkám přidávají obvykle na začátku kultivace. Pokud testovaná látka mění délku buněčného cyklu, je třeba přizpůsobit dobu kultivace.

Buňky se exponují testované látce v přítomnosti i bez použití **metabolického aktivačního systému (MAS)**. Roztok testované látky a MAS se sterilizuje filtrací Milliporovým filtrem  $0,45\ \mu\text{m}$ .

### Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů

1. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
2. Přidat cca 10 ml hypotonizačního roztoku, nechat stát 10 min při lab. teplotě
3. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min

4. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 1
5. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
6. Přidat cca 5 ml metanolu
7. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
8. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 2
9. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
10. Po slítí supernatantu sediment dobře promíchat a nakapat 4 - 6 kapek na mokré, vychlazené podložní sklo. Od každé kultury kapeme 2 skla.

Po každé centrifugaci supernatant slít a sediment důkladně resuspendovat.

### Barvení preparátů

Po usušení skel volně na vzduchu barvíme preparáty 5 % roztokem Giemsa - Romanovski :

Giemsa	5 ml
dest. H <sub>2</sub> O	80 ml
Sorensenův pufr	15 ml

Doba barvení je 4 - 5 minut, poté preparáty důkladně opláchneme pod tekoucí vodou.

Předmytá podložní skla jsou uchovávána v chromsírové směsi. Před použitím jsou skla jednotlivě promyta pod tekoucí vodou , naložena do destilované vody a vychlazená v chladničce.

### Mikroskopická analýza

Chromozómové aberace se hodnotí v mikroskopu při zvětšení 1 000x pod imerzním olejem pro fluorescenci .

**gap:** jako gap je hodnoceno porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid, je-li mezera přerušené chromatidy stejná nebo užší, než je šířka (tloušťka) dané chromatidy.

*Různě intenzivní projasnění chromatid se objevují v případech sekundární konstriktce u chromozómů č. 1, 9 a 16. Světlé proužky se objevují při použití teplého (více než 200°C) Sørensenova pufru.*

**zlom:** jako zlom je hodnoceno porušení kontinuity jedné nebo obou chromatid, nastane-li některý z těchto případů:

- mezera přerušené chromatidy je větší než šířka chromatidy analyzovaného chromozómu
- distální (koncový) fragment je dislokovaný nebo mimo osu chromatidy
- kratší jedna chromatida (delece).

**fragment:** je protáhlá část chromatidy bez centromery (delší, než je šířka chromatidy).

**kruhový fragment:** je kulovitá část chromatidy (o průměru stejném nebo větším, než je šířka chromatidy).

**minute:** je kulovitá část chromatidy (o průměru menším, než je šířka chromatidy).

**dicentrický chromozóm:**

- 44 centromer + DCH + 1-2 fragmenty
- 44 centromer DCH bez fragmentů (často se ztrácí)
- 45 centromer + „DCH“ bez fragmentů = normální metafáze + sekund. konstriktce nebo překřížené chromatidy.

**prsténčitý (ring) chromozóm:**

**polyploidní buňka:** metafáze, kde je vyšší počet centromer než 46 o celý násobek haploidní sady - 23 chromozómů.

**aneuploidní buňka:** metafáze, kde je vyšší nebo nižší počet chromozómů než 46.

**Neanalyzují se:**

- nedostatečně nebo nestejně obarvené a přebarvené metafáze
- metafáze s nedostatečně oddělenými chromatidami
- prometafázické chromozómy
- pozdní metafáze (chromatidy jsou v centromere od sebe odděleny)
- nedostatečně rozprostřené metafáze (chromozómy se překrývají)
- splývající metafáze (nelze odlišit, který chromozóm patří do které metafáze)
- mechanické poškození chromozómů (vzniklé při zpracování nebo poškrábáním nátěru)
- metafáze, které mají jiný počet centromer než  $46 \pm 1$  (aneuploidie lze spolehlivě odlišit jen metodou FISH)

**Kategorie poškození chromozómů:**

**G1, Z1, V1:** chromatidový gap, zlom, výměna

**G2, Z2, V2:** chromozómový (isochromatidový) gap, zlom, výměna (polycentrické chromozómy, ringy)

**Aberantní buňky:** buňky obsahující: Z1, Z2, V1, V2  
pulverizace, fragmentace, aneuploidie

**Gapy:** nezapočítávají se do aberantních buněk

**Zásady pro výpočet počtu zlomů na buňku (Z/B):**

Z1, Z2 = 1 zlom

V1, V2 = 2 zlomy

párové fragmenty v buňce s dicentrickým chromozómem se nezapočítávají do Z/B pulverizace; fragmentace se nezapočítávají do Z/B; gapy se nezapočítávají do Z/B

## **8. Rušivé vlivy**

kontaminace vzorků, médií a laboratorního nádobí, možný výpadek el. energie během kultivace, lidský faktor

## **9. Validace metody**

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně normované a používané více než 30 let laboratořemi celého světa a ověřované mezilaboratorním porovnáváním.

### **Literatura**

**Hungerford, D. A.:** Leukocyte cultured from small inculla of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain. Technol.*, 40, 1965, 333-338

**Savage J. R. K.:** Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, 13, 1976, 103-122

**Evans, H. J.:** Cytological methods for detecting chemical mutagens. *Chemical mutagens, principles and methods for their detection*, Vol. 4, Ed. A. Hollaender Plenum, New York, London (1976) pp. 1-29.

**Preston, R. J. et al.:** Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research* 87:143-188 (1981).

**Carrano A.V., Natarajan A.T.:** Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.*, 1988, 204, 379 – 406

**OECD Guidelines** for Chemicals, 22<sup>nd</sup> January, 2001

**Vyhláška** Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.( Změna: 208/2001 Sb.)

**specifičnost** - metoda je specifická pro detekci strukturálních a numerických chromozómových aberací v savčích somatických buňkách in vitro a není ovlivněna žádnými ostatními složkami

**kladná odchylka** - k odlišení falešně pozitivního výsledku slouží použití pozitivní a negativní kontroly

**negativní odchylka** - falešně negativní výsledek hrozí při analýze technicky nekvalitních preparátů, které se však podle metodiky nemají analyzovat (Stand. metod.)

**mez stanovitelnosti** - je dána detekcí 1 aberace

**opakovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za neměnných podmínek je variabilní, způsobená stochastickou distribucí buněk na mikroskopickém preparátu a nízkou frekvencí analyzovaných změn k celkovému počtu buněk (cca 1 : 10<sup>2</sup>)

**reprodukovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za různých podmínek je vysoká

## 10. Vyjádřování nejistot měření

Pro vyjádření nejistoty měření byl použit postup podle Suchánka (Kvalimetrie 7) pro výpočet relativní a rozšířené nejistoty pomocí směrodatné odchylky:

Počet analyzovaných buněk	Počet nalezených aberantních b.
100	1
100	3
100	2
100	2
100	1

analyzovaných buněk: 500  
nalezených aberantních b.: 9  
rozptyl: 1 - 3  
průměrná hodnota: 1,80 %

**směrodatná odchylka:**  $S = 2 \times k = 0,43 \times 2 = 0,86$   
**relativní sm. odch.:**

$$\text{RSD} = \frac{0,86 \times 100}{9} = 9.6\%$$

**rozšířená nejistota (chyba metody):**  $= 2 \times 9,6 = 19,2 \%$

Procenta aberantních buněk (% AB.B.) se uvádějí na dvě desetinná čísla. Počet zlomů na buňku (Z/B) se uvádí na tři desetinná čísla.

Výpočty se provádějí analýzou variance metodou ANOVA. V případě významných rozdílů standardních odchylek (SD) uvedený program používá pro srovnání průměrů Kruskal-Wallisův test.

## 11. Kontrola kvality

Uskutečňuje se analýzou v NRL zhotovených a zakódovaných preparátů. Firma komerčně připravující standardní mikroskopické preparáty pro analýzu chromozómů není známa.

## PRŮVODKA PRO CYTOGENETICKOU ANALÝZU MIKROJADER

---

Pořadové číslo: .....

**Jméno:** ..... **Příjmení:** .....

**Rok narození:** ..... **Rodné číslo:** .....

**Bydliště:** .....

**Datum odběru:** .....

---

**pracoviště v době odběru:** .....

v riziku: **ano – ne**

**virové onemocnění** v posledních 3 měsících: **ano – ne**

**jiná onemocnění (jaká):** .....

**léky před odběrem:** **ano – ne**

**jaké:** .....

pravidelné, dlouhodobé užívání léků: **ano – ne**

**jakých:** .....

hormonální antikoncepce: **ano – ne**

pití **kávy:** **ano – ne**

kolik denně: .....

pití **alkoholu** 24 h před odběrem: **ano – ne**

pivo, víno, tvrdý – kolik: .....

**nekuřák** (jak dlouho): **ano – ne**

**kuřák** (kolik denně): **ano – ne**

**RTG vyšetření** v posledních 3 měsících: **ano – ne**

**radioterapie** **ano – ne**

(kdy): .....

nárazová **expozice chemickým látkám** v zaměstnání: **ano – ne**

kdy a jakým: .....

práce s chemikáliemi mimo zaměstnání (barvy, postřiky): **ano – ne**

kdy a s jakými: .....

**očkování** v posledních 3 měsících (jaké): **ano – ne**

---



Výzkumný ústav veterinárního lékařství  
Hudcova 70, 621 32 Brno  
Tel: +420 5 4132 1241; Fax: +420 5 4121 1229;  
E-mail:<rubes@vri.cz>

## **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

### **2. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů**

#### **Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s celochromozomovými sondami**

**Zpracoval:** RNDr. Petra Musilová, Ph.D., Mgr. Olga Řezáčová,  
Doc. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje detekci získaných strukturálních chromozómových přestaveb v savčích (lidských) buňkách, pomocí fluorescenčně značených malovacích DNA sond a fluorescenční mikroskopie.

## **2. Definice**

Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako chromozómové aberace, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

## **3. Princip metody**

Tento cytogenetický test umožňuje detekci zejména stabilních strukturálních aberací, konvenční technikou neidentifikovatelných, v savčích buňkách, - nejčastěji v periferních lymfocytech. Stabilní chromozomální přestavby nezpůsobují ztrátu chromozomálního materiálu, mohou se přenášet z buňky na buňku, kumulují se v organismu a jsou odrazem dlouhodobé expozice genotoxickými látkami. Lymfocyty jsou *in vitro* stimulovány fytohemaglutininem, zastaveny pomocí kolcemidu v metafázi, zpracovány klasickou metodou (air-dry method) a použity pro přípravu mikroskopických preparátů. Preparáty jsou hybridizovány s fluorescenčně značenými celochromozomovými sondami (tzv. painting) a podbarveny vhodným fluorescenčním barvivem. Metafázní buňky jsou analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu.

## **4. Bezpečnost práce**

Metodika vyžaduje práci s toxickými látkami (formamid).

Z hlediska bezpečnosti práce je nutné:

- a) dodržovat zásady běžné pro práci v chemické laboratoři, navíc pro kontakt s toxickými látkami
- b) používat pomůcky osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky
- c) dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí, likvidovat odpad bezpečným způsobem.

## **5. Chemikálie a spotřební materiál**

### **Základní chemikálie**

***Celochromozómová sonda pro chromozóm 1*** (koncentr.)  
přímo značená Cy3 (10 testů)

Cambio – k. č. 1153-1Cy3  
uchovávat při -20°C  
chránit před světlem !

***Celochromozómová sonda pro chromozóm 4*** (koncentr.)  
přímo značená FITC (10 testů)

Cambio - k. č. 1083-4F  
uchovávat při -20°C  
chránit před světlem!

<b>Hybridizační pufr</b>	Cambio (dodáván se sondou) uchovávat při -20°C
<b>Formamid</b>	Fluka - k.č. 47670 uchovávat při 4 - 10°C
<b>Vectashield mounting medium</b>	Vector H-1000 uchovávat při 4-10°C
<b>DAPI</b> (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma D-9542 uchovávat při -20°C
<b>Imerzní olej pro mikroskopii</b>	Olympus uchovávat při laboratorní teplotě
<b>Ethanol 96%</b>	uchovávat při laboratorní teplotě

### **Roztoky**

<b>Denaturační roztok</b> (70%formamid/2xSSC)	množství na 1 Coplinovu skleněnou nádobku: 28 ml formamidu a 4 ml 20xSSC (pH 5,35) doplnit do 40 ml deionizovanou vodou, upravit pH na 7-7,2 uchovávat při 4 - 10°C max. 1 měsíc
<b>Vymývací roztok</b> (50% formamid/2xSSC)	množství na 2 Coplinovy skleněné nádobky: 40 ml formamidu a 8 ml 20xSSC (pH 5,35) doplnit do 80 ml deionizovanou vodou, upravit pH na 7-7,2 uchovávat při 4 - 10°C max. 1 měsíc
<b>Etanolová řada</b>	70%, 85%, 96% etanol
<b>20x SSC zásobní roztok</b>	175,32 g chloridu sodného a 88,23 g citrátu sodného, doplnit do 1 l destilovanou vodou, přefiltrovat, autoklávovat, uchovávat při 4 - 10°C
<b>2xSSC</b>	množství na 2 Coplinovy skleněné nádobky: 10 ml 20xSSC (pH 7), doplnit do 100 ml destilovanou vodou, připravovat vždy čerstvé
<b>0,1xSSC</b>	množství na 2 Coplinovy skleněné nádobky: 0,5 ml 20xSSC (pH 7), doplnit do 100 ml destilovanou vodou, připravovat vždy čerstvé

<b>DAPI - zásobní roztok I</b>	ředíme v McIlvainově pufru (1 mg/ml) skladovat při -20°C
<b>DAPI - zásobní roztok II</b>	připravíme zředěním zás. r. II v McIlvainově pufru (6 µg/ml), skladovat při -20°C
<b>McIlvainův pufr</b>	5,86 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O a 0,382 g kyseliny citronové doplnit do 100 ml deionizovanou vodou, upravit pH na 7, přefiltrovat, uchovávat při 4 - 10°C.
<b>DAPI v antifade</b> (0,24 µg/ml)	4 µl zásobního DAPI II (6 µl/ml) doplnit do 100 µl antifade uchovávat při 4 - 10°C, chránit před světlem

### **Spotřební materiál:**

- automatické pipety (rozsah 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl) s příslušnými špičkami
- laboratorní sklo a plast (mikrozkušavky, atd.)
- Coplinovy skleněné a plastové nádoby s kruhovou podstavou na 5 skel, s víčkem
- mikroskopická podložní skla Superfrost
- mikroskopická krycí sklíčka (24x24 mm nebo 22x22 mm)
- digitální minutky
- diamantové pero
- rubber cement (lepidlo) nebo potravinová folie
- vlhká hybridizační komůrka (plastová krabička s víčkem a navlhčeným dnem)

### **6. Přístroje a pomocná zařízení**

- chladnička (4 až 10°C)
- mraznička (od -20°C)
- centrifuga na mikrozkušavky
- termostat (37 ± 1°C)
- třepačka na zkumavky
- vodní lázeň s regulací teploty
- topná ploténka (nastavená na teplotu asi 37°C)
- analytické váhy
- pH metr
- mikroskopy: mikroskop s fázovým kontrastem (zvětšení objektivů 10x a 20x)  
fluorescenční mikroskop Olympus BX 60 s objektivy (zvětšení 20x, 100x), s fluorescenčním filtrem pro FITC/Texas Red a jednoduchými fluorescenčními filtry pro DAPI, FITC a Texas Red

### ***Přístroje a počítačové programy, které jsou velmi vhodné, ale ne nezbytné:***

- CCD kamera (VC 45, Germany)
- počítačová analýza obrazu ISIS (META systems GmbH, Germany)
- počítačový program Anomaly counter (ps soft, Czech Rep.)
- termocykler (tento přístroj je nahraditelný vodní lázní a termostatem)

## **7. Pracovní postup**

### **Fluorescenční hybridizace in situ s celochromozómovými sondami**

#### ***Příprava preparátu***

- pro hybridizaci se používají mikroskopické preparáty metafázních chromozómů jeden den staré nebo skladované při -20°C v dobře uzavřené krabičce za přítomnosti desikantu (silikagel) nebo v atmosféře dusíku
- preparát prohlédnout v mikroskopu pomocí objektivu pod fázovým kontrastem, diamantovým perem vyznačit na skle oblast s největší hustotou mitóz (velikosti krycího skla)
- sklo dehydratovat ve vzestupné ethanolové řadě (70%, 85%, 96% ethanol v plastových Coplinových nádobkách) - po 2 minutách při laboratorní teplotě
- sklo nechat dokonale oschnout

#### ***Příprava hybridizační směsi na 1 test***

- zásobní mikrozkuhavky se sondami a hybridizačním pufrem nechat vytemperovat při laboratorní teplotě, po celou dobu manipulace chránit před světlem
- v mikrozkuhavce smíchat:
  - 2 µl celochromozomové sondy pro chrom. 1 - Cy3
  - 2 µl celochromozomové sondy pro chrom. 4 - FITC
  - 6 µl hybridizačního pufru
- promíchat na třepačce
- krátce centrifugovat

#### ***Denaturace a prehybridizace sondy***

- mikrozkuhavku s namíchanou hybridizační směsí umístit do plovoucí podložky (např. kousek polystyrenu s malým otvorem) a na 10 min vložit do vodní lázně předem vytemperované na 72°C (denaturace)
- mikrozkuhavku přemístit do termostatu s 37°C na dobu 80 minut (prehybridizace)

*Pozn.: Pro denaturaci a prehybridizaci hybridizační směsi je možné využít termocykler, který příslušně naprogramujeme.*

### ***Denaturace preparátu***

- 15-20 minut před ukončením prehybridizace vložit připravené sklo se vzorkem do denaturačního roztoku (70% formamid/2x SSC) vytemperovaného na 72°C na dobu 2 minut
- přemístit postupně do 70%, 85% a 96% ethanolu vychlazeného v ledničce - po 2 min.
- vložit do 96% ethanolu (laboratorní teploty) na 2 min.
- nechat dokonale oschnout při laboratorní teplotě

### ***Hybridizace***

- krycí sklo a připravené podložní sklo se vzorkem položit na topnou ploténku vyhřátou asi na 37°C
- hybridizační směs napipetovat na krycí sklo, přiložit podložní sklo vzorkem na krycí sklo a ihned otočit, lehce vytlačit vzduchové bubliny
- orámovat krycí sklo rubber cementem, nebo celé sklo zabalit do kousku potravinové folie (pro orámování lepidlem je vhodnější použít menší krycí sklo 22x22 mm)
- sklo vložit do vlhké hybridizační komůrky a nechat inkubovat přes noc při 37°C

### ***Vymývání nespecificky navázané sondy***

- vytemperovat vodní lázeň na 42°C s připravenými roztoky (vymývací roztok, 2xSSC, 0,1xSSC v Coplinových skleněných nádobkách)
- odstranit lepidlo nebo folii ze skla, sklo vložit do 2xSSC na 5 min/42°C (nechat samovolně odplavit krycí skličko)
- přemístit do 2xSSC na 5 min/42°C
- vymýt ve 2 vymývacích roztocích (50% formamid/2xSSC) po 5 min/42°C
- vymýt ve 2 roztocích 0,1xSSC po 5 min/42°C

### ***Montování skla do DAPI/antifade***

- sklo vyjmout z 0,1xSSC a postavit vertikálně hranou na savý papír, nechat stéci přebytečnou tekutinu, ale nenechat uschnout
- na krycí sklo napipetovat 8 µl DAPI/antifade (0,24 µg/ml), přiložit podložní sklo vzorkem na krycí sklo a ihned otočit, lehce vytlačit vzduchové bubliny
- sklo uložit před mikroskopickou analýzou na 5 minut do tmy
- nahybridizovaná skla uchovávat ve tmě při 4 - 10°C

### ***Mikroskopická analýza***

- Chromozómové aberace se hodnotí ve fluorescenčním mikroskopu při zvětšení 1 000x za použití imerzního oleje.

- Vyhodnocuje se 1000 metafázních buněk u každého vzorku (daného jedince).
- Analyzují se jen na první pohled úplné metafáze s dobrým hybridizačním signálem.
- Je velmi vhodné snímat aberantní buňky pomocí CCD kamery do počítačového programu umožňujícího analýzu obrazu (např.: ISIS, MetaSystems, Altlussheim, Germany), kde mohou podle potřeby být dále analyzovány a archivovány.
- Aberace jsou analyzovány podle „Protocol for Aberration Identification and Nomenclature - PAINT“ (Tucker et al. 1995).
- Výsledky analýzy se zapisují do předtištěných protokolů (viz. příloha). K průběžnému ukládání dat je možné použít počítačový program Anomaly Counter.

### **Popis nomenklatury PAINT**

- Identifikace a počet chromozomálních výměn se omezuje na události, které jsou výsledkem spojení chromozómů různých barev.
- Každý abnormálně obarvený chromozóm nebo fragment se popisuje individuálně.
- Abnormální chromozóm je nejprve zařazen do jedné nebo více tříd přestaveb, které jsou popsány zkratkou: t (translokace), dic (dicentr), ins (insece), ace (acentrický fragment) atd. (ISCN, 1995).
- Za touto zkratkou bezprostředně následuje pár závorek obsahující písmena popisující uspořádání barevných segmentů. V popisu aberací má význam postavení centroméry. Velkými písmeny se popisují části chromozómů obsahující centroméru, malými písmeny části bez centromery.
- Písmena „A“, „a“ jsou používána pro hybridizací neobarvené (pouze podbarvené DAPI) centrické a acentrické části.
- Písmena „B“, „b“ („C“, „c“) jsou používána pro hybridizací obarvené centrické a acentrické segmenty chromozómu 1 (chromozómu 4).

### **Výpočet genomické frekvence ( $F_G$ )**

Výsledek se udává jako genomická frekvence ( $F_G$ ) stabilních chromozomových výměn (Lucas et al., 1993). Jedná se o teoretický výpočet frekvence výměn pro celý genom odvozený ze skutečně vyšetřeného podílu genomu (obarvených chromozómů).

$$F_G = F_{rg} / 2,05 [f_r(1-f_r) + f_g(1-f_g) - f_r f_g]$$

$F_G$  = celková genomická frekvence translokací

$F_{rg}$  = frekvence translokací zjištěná po hybridizaci s dvěma různými celo-chromozomovými sondami

$f_r$  = podíl genomu představovaného jedním hybridizovaným chromozómem (označeným červenou barvou)

$f_g$  = podíl genomu představovaného druhým hybridizovaným chromozómem (označeným zelenou barvou)

Chromozóm 1 představuje 8,4 % lidského genomu  $\rightarrow f_r = 0,084$

Chromozóm 4 představuje 6,3 % lidského genomu  $\rightarrow f_g = 0,063$

Z toho vyplývá, že:

$$2,05[f_r(1-f_r)+f_g(1-f_g)-f_rf_g] =$$

$$=2,05[0,084(1-0,084)+0,063(1-0,063)-0,084 \times 0,063] = 0,26790015$$

Toto číslo se nemění, pokud používáme sondy pro chromozómy 1 a 4.

Genomická frekvence translokací v *jedné buňce* se pak vypočítá:

$$F_G = F_{rg}/0,26790015$$

$$\text{tj.: (počet translokací/počet vyšetřených buněk)/0,26790015}$$

Většinou se jako výsledek udává genomická frekvence translokací ve 100 buňkách.

**Průměrné hodnoty FG/100 buněk získané vyšetřením neexponované populace v České republice jsou:**

novorozenci	0,07	(0 - 0,4)
dospělí do 50 let	1,0 - 1,5	(0 - 4,0)
dospělí nad 50 let	1,5 - 2,0	(0 - 5,5)

## **8. Rušivé vlivy**

- špatná kvalita DNA sondy
- špatná kvalita výchozího hybridizovaného preparátu (především z hlediska morfologie)
- možný výpadek el. energie během hybridizace v termostatu
- lidský faktor

## **9. Validace metody**

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně používané metody.



## Literatura

**Finnon P, Lloyd DC, Edwards AA:** Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int J Radiat Biol* 1995;68:429-435

**Lucas JN, Sachs RK:** Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1484-1487

**Rubeš J, Kuchárová S, Vozdová M, Musilová P, Zudová Z:** Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in medical personnel by means of FISH. *Mutat.Res.-Genet.Toxicol.* 1998;412:293-298

**Tucker JD, Lee DA, Moore DH:** Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation in vitro. *Int J Radiat Biol* 1995;67:19-28

**Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C:** A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 1995;68:211-221

**Tucker JD, Ramsey MJ, Lee DA, Minkler JL:** Validation of Chromosome Painting as a Biodosimeter in Human Peripheral Lymphocytes Following Acute Exposure to Ionizing Radiation In vitro. *International Journal of Radiation Biology* 1993;64:27-37

**specifičnost** - metoda je specifická pro detekci strukturálních chromozómových aberací, které zahrnují chromozomy 1 a 4, v lidských somatických buňkách *in vitro* a není ovlivněna žádnými ostatními složkami

**kladná odchylna** - k odlišení falešně pozitivního výsledku slouží posouzení nejasných aberantních buněk dalším vyškoleným pracovníkem (vzhledem k nestabilitě fluorescenčního signálu je velmi vhodné použít program pro analýzy obrazu)

**negativní odchylna** - falešně negativní výsledek hrozí při analýze technicky nekvalitních preparátů, které se však podle metodiky nemají analyzovat

**mez stanovitelnosti** - je dána detekcí 1 aberace

**opakovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za neměnných podmínek je variabilní, způsobená stochastickou distribucí buněk na mikroskopickém preparátu a nízkou frekvencí analyzovaných změn k celkovému počtu buněk (cca 1 : 10<sup>3</sup>)

**reprodukovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za různých podmínek je vysoká

## 10. Kontrola kvality

Uskutečňuje se analýzou v laboratoři zhotovených a zakódovaných preparátů. Firma komerčně připravující standardní mikroskopické preparáty pro analýzu chromozómů není známa.

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 340; 267 082 585; fax: 267 082 378;  
e-mail: hbavorova@szu.cz; ocadlikova@seznam.cz; rossner@szu.cz

## **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

### **3. Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů Technika FPG Výměny sesterských chromatid (SCE)**

**Původ metody:** Perry, P.E., Wolf, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251, 156 - 158

Zpracoval: RNDr. Hana Bavorová, RNDr. Danuše Očadlíková

## **Výchozí zdroj:**

**Perry, P.E., Wolf, S.:** (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158

Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí  
**Standardní metodika, Příloha AHEM č.20/1989**, 16-17

**Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.**( Změna: 208/2001 Sb.)

**OECD Guidelines For Chemicals**, 22nd January, 2001

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje detekci recipročních výměn DNA mezi dvěma sesterskými chromatidami chromozómu - v savčích (lidských) buňkách in vitro pomocí optického mikroskopu. SCE reprezentují výměny identických sekvencí DNA mezi replikačními produkty v identických (homologních) lokusech.

## **2. Definice**

Ovlivnění genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako SCE, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

## **3. Princip metody**

Tento cytogenetický test in vitro je krátkodobý test pro detekci recipročních výměn DNA mezi sesterskými chromatidami chromozómu v kultivovaných savčích buňkách. Lze použít jak kultur stabilizovaných buněčných linií, tak primárních buněk, např. buňky čínské křečka nebo lidské lymfocyty. Buňky se kultivují po dobu dvou replikačních cyklů v médiu obsahujícím BrdU. Ke konci kultivace se na buněčné kultury působí mitotickým jedem, např. kolchicinem, k akumulaci dělicích se buněk (C-metafáze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a pak z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem a metafázické buňky analyzovány z hlediska počtu SCE.

## **4. Bezpečnost práce**

**Metodika vyžaduje práci s:**

- žiravinami (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- ostatními jedy (kolchicin)
- zvláště nebezpečnými jedy (metanol)
- karcinogeny a mutageny (např.:Thiotepa, Cyklofosfamid, N-Nitrosodimethylamin, BrdU)

Dodržování zásad běžných pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři, navíc kontakt s chemickými látkami typu mutagenů a karcinogenů.

Používání pomůcek osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky.

Dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami, s infekcí, včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie a spotřební materiál**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a., nebo reagent grade.

### **Základní chemikálie**

Metanol p.a.	Kulich, Hradec Králové
Kyselina octová, 99 %, p.a.	Penta, Chrudim
Chlorid draselný, p.a.	Merck
Glutamin, 3 %, p.a.	Sevac
Colchicin pulv., reagent gr.	Calbiochem,US
Phytohaemagglutinin HA 15, reagent gr.	Murex , GB
5-Bromo-2'- deoxyuridine (BrdU), reagent gr.	Serva, US
Bisbenzimid H 33258 ( Hoechst ), reagent gr.	Serva, US
Kyselý uhličitan sodný, 7.5 %, reagent gr.	Sevac
Cyklofosfamid, 200 mg, injekce	Orion, Finland
Thiotepa, 15 mg, injekce	Lederle, SRN
Deionizovaná voda	
Heparin 5.000 j., injekce	Spofa
Chromsírová směs	

### **Roztoky**

Médium pro kultivaci buněk - RPMI 1640 5x konc. Sevac	uchovávat při 4 - 10 °C
Bovinní sérum pro TK	uchovávat při minim. - 20°C, po rozmražení spotřebovat do 1 měsíce
glutamin - 3 %	uchovávat při 4 - 10°C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
kyselý uhličitan sodný 7.5 %	uchovávat při 4 - 10°C otevřenou ampuli neuchovávat
PHA - HA 15 ml	uchovávat při 4 - 10°C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
zásobní roztok kolchicinu	10 mg rozpustit v 10 ml fyziol. roztoku, uchovávat při 4 - 10°C do spotřebování

pracovní roztok kolchicinu	0,05 ml zásobního roztoku do 10 ml fyziol. roztoku, neuchovávat
0.55% roztok chloridu draselného (hypotonizační roztok)	0,55 g KCl rozpustit ve 100 ml deionizované vody, při 37° C uchovávat do spotřebování
H <sub>2</sub> O : kys. octová : metanol (fixační roztok č. 1)	92 ml : 5 ml : 3 ml neuchovávat
metanol : kys. octová (fixační roztok č. 2)	3 díly : 1 dílu neuchovávat
Sörensenův pufr, pH 6.8 SZÚ	<i>roztok A:</i> 1,376 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> do 400 ml deionizované vody  <i>roztok B:</i> 5,52 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O do 600 ml deionizované vody  roztoky slít a uchovávat 4 - 10°C
5 % roztok Giemsa-Romanovski Merck	Giemsa.....5 ml Sörensenův pufr.....15 ml H <sub>2</sub> O deionizovaná... .....80 ml
zásobní roztok BrdU	10 mg rozpustit v 10 ml sterilní deionizované vody, uchovávat při 4- 10°C v temnu do spotřebování
zásobní roztok Hoechst	0,5 mg rozpustit v 10 ml sterilní deionizované vody, uchovávat při 4- 10°C v temnu do spotřebování
pracovní roztok Hoechst	1 díl zásobního roztoku přidat do 9 dílů destil. vody

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

### **Přístroje**

- chladnička (4 až 10°C)
- mraznička (od - 20°C)
- centrifuga (od 1 000 ot/min)
- vodní lázeň (60 ± 2° C)

- termostat ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) - teplota kontrolována kalibrovaným teploměrem při provozu denně
- germicidní trubice (30 W)
- třepačky
- mikroskopy (vysoká rozlišovací schopnost při zvětšení 1.000 x): Axiolab (Zeiss); Olympus BX 60 F; Olympus BX 40 F; Olympus CHS-G-CH-2; Amplival

### **Pomocná zařízení**

- vodní vývěva
- automatické pipety
- laboratorní sklo a plast (kultivační lahve - Falcon, pipety atd.)
- plynové kahany
- germicidní zářivky
- analytické váhy

## **7. Pracovní postup**

### ***a) odběr krve***

- dezinfikovat loketní jamku Septonexem nebo Jodisolem
- do stříkačky s jehlou na jedno použití natáhnout cca 0.1 ml heparinu/1 ml krve, nebo použít vakutainer s heparinem
- odebrat 1 ml krve (ev. podle potřeby více)
- jehlu na stříkačce krýt sterilním krytem a stříkačku s krví ihned několikrát převrátit, aby se dobře promíchala s heparinem
- stříkačku nebo vacutainer uložit do chladničky při teplotě 4 - 10°C

### **Pozor! Krev nesmí zmrznout.**

Pro každou osobu je vyplněna „Cytogenetická průvodka“, která je do laboratoře předána spolu s příslušnou krví a dále archivována.

### ***b) transport krve***

Je-li třeba krev transportovat z místa odběru do laboratoře, pak je třeba použít transportních chlazených termonádob, kde je krev po dobu mezi odběrem a předáním v laboratoři udržována při teplotě 4 - 10°C.

## **Kultivace**

### ***Biologické monitorování***

Kultivace začíná do 24 hod po odběru krve, v mimořádných případech lze krev použít do 3 dnů po odběru. Kultivace probíhá v kultivačních nádobách v poměru 7,5 ml média,  $0,6 \pm 0,2$  ml krve a 0,08 ml zásobního roztoku BrdU.

Kultivační médium pro 1 kulturu:	RPMI 1640	1,06 ml
	bovinní sérum	1,80 ml
	H <sub>2</sub> O	4,24 ml
	glutamin	0,10 ml
	NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	0,16 ml
	PHA HA 15	0,10 ml
	BrdU	0,008ml

Lahvičky musí být pevně uzavřeny a obsah dobře promíchán. Kultury se umístí do termostatu při teplotě 37±1°C na 72 hod. Dvě hodiny před koncem kultivace se přidá 0,8 ml pracovního roztoku kolchicinu. Kultura se dobře promíchá a dále kultivuje.

### ***Testování látek***

Kultivace probíhá v kultivačních nádobách v poměru 7,5 ml kultivačního média + 0,6 ± 0,2 ml plné heparinované krve + 0,08 ml roztoku testované látky + 0,08 ml zásobního roztoku BrdU. Nádoby musí být pevně uzavřeny a obsah dobře promíchán. Kultury se umístí do termostatu. Doba kultivace je 72 hod, dvě hodiny před koncem kultivace se přidá 0,8 ml pracovního roztoku kolchicinu.

- Lidské periferní lymfocyty jsou exponovány testované látce v přítomnosti i za absence metabolického aktivačního systému ( MAS). MAS je připravován z S9 frakce jaterního homogenátu potkanů doplněného směsí kofaktorů.

Pro každý experimentální bod se použijí dvě kultury.

Jako ***negativní kontrola*** se použije:

- ředitlo (fyziol. roztok, DMSO)
- metabol. aktivační systém (MAS)
- ředitlo + MAS
- neovlivněná kultura

Jako ***pozitivní kontrola*** se použije

- Thiotepa ( $10^{-6}$  M) přímý klastogen
- Cyklofosfamid ( $10^{-4}$  M) nepřímý klastogen
- s MAS a bez MAS

***Koncentrace látky:*** použijí se nejméně tři koncentrace testované látky. Musí se lišit nejméně o jeden řád. Nejvyšší koncentrace musí inhibovat mitotickou aktivitu o 50%, nebo vykazovat jiné známky toxicity. Maximální koncentrace je 5 mg/ml.

***Doba expozice*** musí pokrývat celý buněčný cyklus. Pokud expozice nepokrývá celou dobu buněčného cyklu, je třeba volit různé doby kultivace, aby se kumulovaly buňky, které byly během expozice v různých fázích buněčného cyklu. Testované látky se k buňkám přidávají obvykle na začátku kultivace.

Pokud testovaná látka mění délku buněčného cyklu, je třeba přizpůsobit dobu kultivace.

Buňky se exponují testované látce v přítomnosti i bez použití *metabolického aktivačního systému (MAS)*. Roztok testované látky a MAS se sterilizuje filtrací Milliporovým filtrem 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů**

Buněčnou suspenzi je třeba chránit před intenzivním světlem!

1. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
2. Přidat cca 10 ml hypotonizačního roztoku, nechat stát 10 min při lab. teplotě
3. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
4. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 1
5. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
6. Přidat cca 5 ml metanolu
7. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
8. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 2
9. Centrifugace krve 3 min při cca 2 000 ot/min
10. Po slití supernatantu sediment dobře promíchat a nakapat 4 - 6 kapek na mokré, vychlazené podložní sklo. Od každé kultury kapeme 2 skla.

Po každé centrifugaci supernatant slít a sediment důkladně resuspendovat.

### **Barvení preparátů**

Barvení je třeba provádět na preparátech starých několik dní, skla je nutno chránit před intenzivním světlem. Sklíčka přelijeme pracovním roztokem Hoechst v Petriho misce a exponujeme UV záření ve vzdálenosti asi 20 cm od zdroje po dobu 90 minut. Po ukončení expozice umístíme skla do kyvety s destilovanou vodou a inkubujeme ve vodní lázni při  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  po dobu 90 minut. Po vychladnutí jsou sklíčka obarvena 5% roztokem Giemsa - Romanovski. Doba barvení je 5 minut, poté preparáty důkladně opláchneme pod tekoucí vodou.

Předmytá podložní skla jsou uchovávána v chromsírové směsi. Před použitím jsou skla jednotlivě promyta pod tekoucí vodou, naložena do destilované vody a vychlazená v ledničce.

### **Cytogenetická analýza**

Hodnotí se mikroskopicky při zvětšení 1 000x pod imerzí.

Analyzují se pouze 2. mitózy v 50 metafázích pro jednu kulturu a výsledek se vyjadřuje jako počet SCE/1 buňku. Výměny v oblasti centromery se nezapočítávají.



## **8. Rušivé vlivy**

kontaminace vzorků, médií a laboratorního nádobí, možný výpadek el. energie během kultivace, lidský faktor

## **9. Validace metody**

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně normované a používané více než 20 let laboratořemi celého světa a ověřované mezilaboratorním porovnáváním.

## **Literatura**

**Perry, P.E., Wolf, S.:** (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158.

**Carrano, A.V., Moore, D.H.:** (1982) The rational methodology for quantifying sister- chromatid exchange in humans. in: J.A. Hendle (Ed.), *New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, New York, pp. 267 - 304.

**Standardní metodika**, Příloha AHEM č.20/1989, 16-17.

**Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.**( Změna: 208/2001 Sb.)

**OECD Guidelines for Chemicals**, 22nd January, 2001

**specifičnost** - metoda je specifická pro detekci recipročních výměn DNA mezi dvěma sesterskými chromatidami chromozómu - v savcích (lidských) buňkách *in vitro* pomocí optického mikroskopu. SCE reprezentují výměny identických sekvencí DNA mezi replikačními produkty v identických (homologních) lokusech. Metoda není ovlivněna žádnými ostatními složkami

**kladná odchylka** - k odlišení falešně pozitivního výsledku slouží použití pozitivní a negativní kontroly

**negativní odchylka** - falešně negativní výsledek hrozí při analýze technicky nekvalitních preparátů, které se ale podle metodiky nemají analyzovat

**mez stanovitelnosti** - je dána detekcí 1 výměny (SCE)

**opakovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za neměnných podmínek je variabilní, způsobená stochastickou distribucí buněk na mikroskopickém preparátu

**reprodukovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za různých podmínek je vysoká

Počet SCE na buňku se uvádí na dvě desetinná místa.

Výpočty se provádějí analýzou variance metodou ANOVA. V případě významných rozdílů standardních odchylek (SD) uvedený program používá pro srovnání průměrů Kruskal-Wallisův test.

## **10. Kontrola kvality**

Uskutečňuje se analýzou v RL zhotovených a zakódovaných preparátů. Firma komerčně připravující standardní mikroskopické preparáty pro analýzu chromozómů není známa.

## PRŮVODKA PRO CYTOGENETICKOU ANALÝZU MIKROJADER

---

Pořadové číslo:

Jméno: ..... Příjmení: .....

Rok narození: ..... Rodné číslo:

Bydliště: .....

---

Datum odběru:

**pracoviště v době odběru:** .....

v riziku: **ano – ne**

**virové onemocnění** v posledních 3 měsících: **ano – ne**

**jiná onemocnění (jaká):** .....

**léky před odběrem:** **ano – ne**

**jaké:** .....

**pravidelné, dlouhodobé užívání léků:** **ano – ne**

jakých: .....

hormonální antikoncepce: **ano – ne**

pití kávy: **ano – ne**

kolik denně: .....

pití **alkoholu** 24 h před odběrem: **ano – ne**

pivo, víno, tvrdý – kolik: .....

**nekuřák** (jak dlouho): **ano – ne**

**kuřák**(kolik denně): **ano – ne**

**RTG** vyšetření v posledních 3 měsících: **ano – ne**

**radioterapie** (kdy): **ano – ne**

nárazová **expozice chemickým látkám** v zaměstnání: **ano – ne**

kdy a jakým: .....

práce s chemikáliemi mimo zaměstnání (barvy, postřiky): **ano – ne**

kdy a s jakými: .....

**očkování** v posledních 3 měsících (jaké): **ano – ne**

---

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

## **Laboratoře genetické toxikologie**

zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 340; 267 082 585; fax: 267 082 378;  
e-mail: [hbavorova@szu.cz](mailto:hbavorova@szu.cz); [ocadlikova@seznam.cz](mailto:ocadlikova@seznam.cz); [rossner@szu.cz](mailto:rossner@szu.cz)

## **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

### **Cytogenetická analýza lidských periferních lymfocytů 4. Mikronukleus test - Modifikace s cytochalasinem B**

**Původ metody:** Fenech, M., Morley, A. A.: Measurement of micronuclei in lymphocytes.  
Mutation Res. 147, 1985, s. 29-36

Zpracoval: RNDr. Hana Bavorová, RNDr. Danuše Očadlíková

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje detekci cytogenetického poškození ve stimulovaných savčích (lidských) periferních lymfocytech *in vitro* pomocí optického mikroskopu.

## **2. Definice**

Poškození genetického materiálu buňky (DNA), analyzované jako mikrojádra, je projevem biologického efektu genotoxických faktorů.

## **3. Princip metody**

Tento cytogenetický test *in vitro* je krátkodobý test, při kterém se stanovuje frekvence mikrojader v kultivovaných savčích buňkách. Mikrojádra vznikají buď v důsledku chromozómových zlomů (pak jsou tvořena centrickým fragmentem), nebo poruchou funkce dělicího vřeténka (mikrojádru je tvořeno celým chromozómem nezačleněným do nově vytvořeného jádra). Mikrojádra se analyzují výhradně v těch lymfocytech, které prošly pouze jedním buněčným dělením. K identifikaci takových lymfocytů se používá inhibice cytokinézy pomocí cytochalasinu B. Lymfocyty jsou pak velké, dvoujaderné. Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a jsou z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem a analyzuje se frekvence mikrojader ve dvoujaderných buňkách.

## **4. Bezpečnost práce**

***Metodika vyžaduje práci s:***

- a) žíravinami (kyselina octová konc., chromsírová směs)
- b) ostatními jedy (cytochalasin B)
- c) zvláště nebezpečnými jedy (metanol)

Dodržování zásad běžných pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři.

Používání pomůcek osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky.

Dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami, s infekcí, včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie a spotřební materiál**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

### **Základní chemikálie**

Metanol, p.a.

Kyselina octová, 99 %, p.a.

Chlorid draselný, p.a.

Glutamin, 3 %, p.a.

Kulich, Hradec Králové

Penta Chrudim

Merck

Sevac

Cytochalasin B, reagent gr.	Sigma - Aldrich
Phytohaemagglutinin HA 15, reagent gr.	Murex, GB
Kyselý uhličitan sodný, 7.5 %, reagent gr.	Sevac
Deionizovaná voda	
Heparin 5 000 j., injekce	Spofa
Chromsírová směs	
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma - Aldrich

### Roztoky

Médium pro kultivaci buněk RPMI 1640 - 5x konc. Sevapharma	uchovávat při 4 - 10° C
Bovinní sérum pro TK Bioveta Ivanovice	uchovávat při minim. - 20°C po rozmražení spotřebovat do 1 měsíce
glutamin - 3 %	uchovávat při 4 - 10°C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
kyselý uhličitan sodný 7.5 %	uchovávat při 4 - 10°C otevřenou ampuli neuchovávat
PHA - HA 15	uchovávat při 4 - 10°C po naředění spotřebovat do 1 měsíce
zásobní roztok cytochalasinu B 5 mg cytochalasinu B do 2,5 ml DMSO	uchovávat při minim. - 20°C možné opakované zmrazování
0.55% roztok chloridu draselného (hypotonizační roztok)	0,55 g KCl rozpustit ve 100 ml deionizované vody, při 37°C uchovávat do spotřebování
metanol : kys. octová (fixační roztok č. 1)	3 díly : 1 dílu neuchovávat
metanol : kys. Octová (fixační roztok č. 2)	3 díly : 1 dílu neuchovávat
metanol (fixační roztok č. 3)	
Sörensenův pufr, pH 6.8 SZÚ	<i>roztok A:</i> 1,376 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> do 400 ml deionizované vody

*roztok B:*  
5,52 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O  
do 600 ml deionizované vody  
roztoky slít a uchovávat 4 - 10°C

5 % roztok Giemsa-Romanovski  
Merck

Giemsa. 5 ml  
Sørensenův pufr 15 ml  
H<sub>2</sub>O neionizovaná 80 ml

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

### **Přístroje**

chladnička (4 až 10°C)  
mraznička (od - 20°C)  
centrifuga (od 800 ot/min)  
termostat (37 ± 0,5°C)  
třepačky  
mikroskopy (vysoká rozlišovací schopnost při zvětšení 1.000 x):  
Axiolab (Zeiss); Olympus BX 60 F; Olympus BX 40 F;  
Olympus CHS-G-CH-2; Amplival

### **Pomocná zařízení**

- vodní vývěva
- automatické pipety
- digitální pipeta
- laboratorní sklo a plast (kultivační lahve - Falcon, pipety atd.)
- plynové kahany
- germicidní zářivky
- analytické váhy

## **7. Pracovní postup**

### ***a) odběr krve***

- dezinfikovat loketní jamku Septonexem nebo Jodisolem
- do stříkačky s jehlou na jedno použití natáhnout cca 0.1 ml heparinu/1 ml krve nebo použít vakutainer s heparinem
- odebrat 1 ml krve (ev. podle potřeby více )
- jehlu na stříkačce krýt sterilním krytem a stříkačku s krví ihned několikrát převrátit, aby se dobře promíchala s heparinem
- stříkačku nebo vakutainer uložit do chladničky při teplotě 4 - 10°C

**Pozor! Krev nesmí zmrznout.**

Pro každou osobu je vyplněna „Cytogenetická průvodka“, která je do laboratoře předána spolu s příslušnou krví a dále archivována.

### *b) transport krve*

Je-li třeba krev transportovat z místa odběru do laboratoře, pak je třeba použít transportních chlazených termonádob, kde je krev po dobu mezi odběrem a předáním v laboratoři udržována při teplotě 4 - 10°C.

### **Kultivace**

Kultivace začíná do 24 hod po odběru krve, v mimořádných případech lze krev použít do 72 h. po odběru. Kultivace probíhá v kultivačních nádobách v poměru 7,5 ml média a 0,6 ± 0,2 ml krve.

#### ***Kultivační médium pro 1 kulturu:***

RPMI 1640	1,06 ml
bovinní sérum	1,80 ml
H <sub>2</sub> O	4,24 ml
Glutamin	0,10 ml
NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	0,16 ml
PHA HA 15	0,10 ml

Falconky musí být pevně uzavřeny a obsah dobře promíchán. Kultury se umístí do termostatu při teplotě 37 ± 0,5°C. 44. hodinu od začátku kultivace se přidá 0,02 ml zásobního roztoku cytochalasinu B (5µg / 1 ml kultury) a obsah dobře promícháme. Celková doba kultivace je 72 hodin.

**Pozor! Nepoužívat kolchicin.**

### **Zpracování kultur a příprava mikroskopických preparátů**

1. Centrifugace kultury 10 min při cca 800 ot/min
  2. Přidat cca 10 ml hypotonizačního roztoku, nechat stát 5 min při lab. teplotě
  3. Centrifugace 5 min při cca 800 ot/min
  4. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 1
  5. Centrifugace 5 min při cca 800 ot/min
  6. Přidat cca 5 ml fixačního roztoku č. 2
  7. Centrifugace 5 min při cca 800 ot/min
  8. Přidat cca 5 ml metanolu
  9. Centrifugace 5 min při cca 800 ot/min
  10. Po odsátí supernatantu sediment dobře promíchat a nakapat 4 - 6 kapek na mokré, vychlazené podložní sklo. Od každé kultury kapat 2 skla.
- Po každé centrifugaci supernatant odsajeme a po kapkách přidáváme hypotonii i fixace. Obsah ve zkumavce jemně protřepeme na třepačce při nízkých obrátkách.

## Mytí skel

Předmytá podložní skla jsou uchovávána v chromsírové směsi. Před použitím jsou skla jednotlivě promyta pod tekoucí vodou, naložena do destilované vody a vychlazena v chladničce.

## Barvení preparátů

Po usušení skel volně na vzduchu barvíme preparáty 5% roztokem Giemsa:

Giemsa	5 ml
dest. H <sub>2</sub> O	80 ml
Sorensenův pufr	15 ml

Doba barvení je 4 - 5 minut, poté preparáty důkladně opláchneme pod tekoucí vodou a necháme uschnout.

## Mikroskopická analýza

Mikrojádra se hodnotí v mikroskopu při zvětšení 1 000x pod imersním olejem pro fluorescenci. Hodnotí se 1000 dvoujaderných buněk a stanoví se frekvence buněk s mikrojádry.

Mikrojádru musí být umístěné v cytoplazmě a nesmí být větší než 1/3 jádra.

S jádrem se nesmí překrývat a může se ho dotýkat maximálně v 1 bodě.

Intenzita zbarvení mikrojádra se musí podobat zbarvení jádra, případně být o něco světlejší. V jedné buňce může být nejvíce 6 mikrojader.

## 8. Rušivé vlivy

kontaminace vzorků, médií a laboratorního nádobí, možný výpadek el. energie během kultivace, lidský faktor

## 9. Validace metody

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně normované, používané laboratořemi celého světa a ověřované mezilaboratorním porovnáváním.

## Literatura

**Carrano A.V., Natarajan A.T.:** Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. Mutation Res., 1988, 204, 379 - 406

**Standardní metodika,** Příloha AHEM č.20/1989, 16-17.

**Vyhláška** Ministerstva zdravotnictví 251/1998 Sb.( Změna: 208/2001 Sb.)

**OECD** Guildelines For Chemicals, 22<sup>nd</sup> January, 2001

**specifičnost** - metoda je specifická pro detekci mikrojader v savčích somatických buňkách *in vitro* a není ovlivněna žádnými ostatními složkami

**negativní odchylka** - falešně negativní výsledek hrozí při analýze technicky nekvalitních preparátů, které se ale nemají analyzovat



**mez stanovitelnosti** - je dána detekcí 1 mikrojádra

**opakovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za neměnných podmínek je variabilní, způsobená stochastickou distribucí buněk na mikroskopickém preparátu a nízkou frekvencí analyzovaných změn k celkovému počtu buněk (cca 1 : 10<sup>2</sup>)

**reprodukovatelnost** - těsnost shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením za různých podmínek je vysoká

## **10. Vyjadřování nejistot měření**

Pro vyjádření nejistoty měření byl použit postup pro výpočet relativní a rozšířené nejistoty pomocí směrodatné odchylky:

<b>Počet analyzovaných buněk</b>	<b>Počet nalezených mikrojadér</b>
1000	7
1000	8
1000	7
1000	6
1000	8

analyzovaných buněk: **5000**

nalezených mikrojadér: **36**

rozptyl: **6 - 8**

průměrná hodnota: **7,2 mikrojadér na 1000 buněk (0,72%)**

směrodatná odchylka:  $S = 2 \times k = 2 \times 0,43 = \mathbf{0,86}$

relativní sm. odch.:  $RSD = \frac{0,86 \times 100}{36} = \mathbf{2,4\%}$

rozšířená nejistota:  $U = 2 \times 2,4 = \mathbf{4,8\%}$

**Výsledek je zatížen chybou  $\pm 4,8\%$**

Při každé analýze je hodnoceno 1000 dvoujaderných buněk a v nich je stanovena frekvence buněk s mikrojádry.

## **11. Kontrola kvality**

- Firma komerčně připravující standardní mikroskopické preparáty pro analýzu mikrojadér není známa.
- Mezilaboratorním porovnáváním.

## PRŮVODKA PRO CYTOGENETICKOU ANALÝZU MIKROJADER

---

### Pořadové číslo:

Příjmení: ..... Jméno: .....

Rok narození: ..... Rodné číslo: .....

Bydliště: .....

Datum odběru: .....

---

**pracoviště v době odběru:**.....

v riziku: **ano – ne**

virové onemocnění v posledních 3 měsících: **ano – ne**

**jiná onemocnění** (jaká):.....

léky před odběrem: **ano – ne**

jaké:.....

pravidelné, dlouhodobé užívání léků: **ano – ne**

jakých:.....

hormonální antikoncepce: **ano – ne**

**pití kávy:** **ano – ne**

kolik denně:.....

pití **alkoholu** 24 h před odběrem: **ano – ne**

pivo, víno, tvrdý – kolik:.....

**nekuřák** (jak dlouho): **ano – ne**

**kuřák** (kolik denně):.....

**RTG** vyšetření v posledních 3 měsících: **ano – ne**

**radioterapie** (kdy): **ano – ne**

nárazová **expozice chemickým látkám** v zaměstnání: **ano – ne**

kdy a jakým:.....

práce s chemikáliemi mimo zaměstnání (barvy, postřiky): **ano – ne**

kdy a jakými:.....

**očkování** v posledních 3 měsících (jaké): **ano – ne**

Ústav experimentálnej onkológie SAV,  
Vlárska 7, 833 91 Bratislava,  
tel.: (+421 2) 59327512, e-mail: exongaba@savba.sk

a

Ústav preventívnej a klinickej medicíny,  
Limbová 14, 833 01 Bratislava,  
tel.: (+421 2) 59369270, e-mail: dusinska@upkm.sk

## ŠTANDARDNÝ OPERAČNÝ POSTUP

### **5. Alkalická jednobunková gélová elektroforéza - kométový test (the alkaline single cell gel electrophoresis - SCGE the alkaline comet assay)**

#### **Pôvod metódy:**

**Östling, O., Johanson, K. J.** (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 123, 291-298.

**Singh, N. P., McCoy, M.T., Tice, R. R. and Schneider, E. L.** (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

**Collins, A. R., Dušinská, M., Gedik, C. M., Stetina, R.:** Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker? *Environ Health Perspect* 104, 1996, 465-469.

Spracovali: RNDr. Alena Gábelová, CSc.,  
Ústav experimentálnej onkológie SAV, Vlárska 7,  
833 91 Bratislava, SR

RNDr. Mária Dušinská, CSc.,  
Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbová 14,  
833 01 Bratislava, SR

## **1. Predmet a vymedzenie pôsobnosti**

Metóda umožňuje detegovať jednoreťazcové zlomy DNA (t.j. priame zlomy DNA ako i prechodné zlomy, ktoré vznikajú v dôsledku opravy poškodenia DNA), alkali-labilné polohy, krížové spojenia DNA-proteín ako i oxidačné a alkylačné poškodenia DNA v eukaryotných bunkách *in vitro* prostredníctvom fluorescenčného mikroskopu. Metóda umožňuje analyzovať poškodenia DNA na úrovni individuálnych buniek vo všetkých typoch buniek, t.j. v bunkách proliferujúcich aj neproliferujúcich, v stabilizovaných bunkových líniiach, primokultúrach, lymfocytoch ako i v bunkách z biopsií. Pre analýzu postačuje malé množstvo buniek (< 50 000).

## **2. Definícia**

Poškodenie genetického materiálu bunky (DNA), ktoré sa manifestuje ako zlom, je prejavom biologického efektu genotoxických faktorov.

## **3. Princíp metódy**

Molekula DNA, ktorá má prirodzene záporný náboj, migruje v elektrickom poli smerom k anóde (kladný pól). Rýchlosť migrácie DNA v elektrickom poli závisí od počtu zlomov a veľkosti molekuly DNA.

Bunky, ktoré sú fixované v agarózovom géli, sa lyzujú. Počas lýzy dochádza k deštrukcii proteínov a iných bunkových komponent, ktoré voľne difundujú v agarózovom géli do lyzujúceho roztoku. Po lyze zostáva v agarózovom géli fixovaná DNA, ktorá si zachováva organizáciu superštruktúry, podobne ako má DNA v živej bunke, spolu so zvyškami jadrovej membrány a matrix. Zlomy, ktoré sú prítomné v DNA, navodia počas alkalického odvíjania DNA relaxáciu superzávitnice DNA. V prítomnosti elektrického poľa je potom relaxovaná DNA ťahaná smerom ku kladnej elektróde. Obraz, ktorý sa pozoruje vo fluorescenčnom mikroskope po zafarbení preparátov vhodným fluorescenčným farbivom s afinitou k DNA, pripomína tvar kométy - kompaktná (nepoškodená) DNA je fixovaná v "hlave", poškodená DNA tvorí "chvost" kométy. Podľa tohto mikroskopického obrazu sa metóda často označuje aj ako kométový test (comet assay).

## **4. Bezpečnosť práce**

***Metodika vyžaduje prácu so:***

- a) žieravinami (konc. roztok hydroxidu sodného)
- b) karcinogénmi a mutagénmi (pozitívne kontroly - metylnitrozoguanidín, MNNG; metylmetánsulfonát, MMS; fluorescenčné farbičky napr. etidium bromid, EtB)

Dodržiavanie zásad, ktoré sú bežné pre prácu v chemickom a mikrobiologickom laboratóriu, navyše kontakt s chemickými látkami typu mutagénov a karcinogénov.

Používanie pomôcok osobnej ochrany - ochranný odev, rukavice, rúška.

Dbáť na zamedzenie kontaminácie osôb aj prostredia pri práci s rozpúšťadlami, s nebezpečnými chemickými látkami, s infekciou, vrátane likvidácie odpadu.

## **5. Chemikálie a spotrebný materiál**

Pre použité chemikálie sa vyžaduje kvalita čistoty p.a..

Pri použití reparačných enzýmov na detekciu oxidačných a alkylačných poškodení DNA sa vyžaduje kvalita chemikálií pre molekulovú biológiu.

### **Základné chemikálie**

Etylalkohol	p.a.
Chlorid sodný (NaCl)	p.a.
Chlorid draselný (KCl)	p.a.
Hydroxid sodný (NaOH)	p.a.
Hydroxid draselný (KOH)	p.a.
Sodná soľ kyseliny etyléndiaminotetraoctovej (Chelaton III)	p.a.
EDTA (etyléndiaminotetraoctová kyselina)	p.a.
Tris(hydroxymetyl)-aminometán	p.a.
Triton X-100 (Calbiochem, Švajčiarsko)	p.a.
Kyselina chlorovodíková (HCl)	p.a.
NMP agaróza (normal melting point)	pre mol. biológiu (Sigma, USA)
LMP agaróza (low melting point)	pre mol. biológiu (GibcoBRL, USA)
Etídium bromid (EtBr)	(Sigma, USA)
Dimetylsulfoxid (DMSO)	(Serva, Nemecko)
Bovinný sérový albumín (BSA)	pre molekulovú biológiu
Hepes pre molekulovú biológiu	
peroxid vodíka	p.a.

### ***Kofaktory pro MAS (viz dále):***

NaDPH	Serva
Glukózo-6-fosfát	Reanal
MgCl <sub>2</sub>	Lachema
KCl	Lachema
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Lachema

## Roztoky

### A. Kultivácia buniek

#### *Lymfocyty*

RPMI 1640 (Gibco) uchovávať pri 4 - 10°C

#### *Stabilizované bunkové línie*

DMEM, MEM atď. (Gibco)

uchovávať pri 4 - 10°C

podľa typu buniek

Bovinné fetálne sérum (Gibco)

uchovávať pri minim. - 20°C,

Pred použitím do kultivačných médií tepelne inaktivovať - 30 min. pri teplote 56°C. Po inaktivácii rozdávkovať a zmraziť.

glutamin 100x konc. (Gibco)

uchovávať pri -20°C

antibiotiká :

penicilín

100 U/ml

streptomycín

100 µg/ml

fosfátový tlmivý roztok PBS

firma Oxoid

(bez Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ionov)

trypsin

Difco, USA

dimetylsulfoxid (DMSO)

pre tkanivové kultúry (Sigma)

hrubé extrakty reparačných enzýmov

Dr. Karel Angelis, CSc.

Ústav experimentálnej botaniky  
AV ČR

#### *Zásobný roztok trypsínu*

Pripraví sa 0,25% roztok trypsínu v tlmivom fosfátovom pufri PBSa. Roztok sa sterilizuje filtráciou cez sadu filtrov Milipor s rôznou porozitou (prefilter, 0,22 µm, 0,45 µm, 0,8 µm a 1,2 µm). Sterilný roztok sa rozdávkuje a udržiava pri teplote -20° C.

#### *Zásobný roztok verzénu*

Pripraví sa 0,02 % roztok EDTA (Chelaton III) v PBS (pH = 7,2). Na indikáciu pH sa do roztoku pridáva xyz fenolová červeň (1,5% ). Roztok sa sterilizuje autoklávovaním 30 min. pri 1 atm (0,101325 Mpa).

#### *Roztok verzén-trypsin*

Pozostáva z roztoku verzénu a trypsínu, ktoré sa zlievajú na koncentráciu 0,025% trypsin alebo 0,04% trypsin podľa typu buniek. Pracovné roztoky sa udržiavajú v chladničke pri 4°C.

## **B. Jednobunková gélová elektroforéza (scge)**

### ***Lyzujúci roztok***

2,5 M NaCl  
0,1 M chelatón III  
0,01 M Tris  
pH = 10  
1% Triton X-100

Pri príprave 1 l lyzujúceho roztoku sa príslušné návažky NaCl, chelatónu III a Trisu rozpustia v 800 ml destilovanej vody. Za stáleho miešania sa pomaly pridávajú granuly kryštalickeho NaOH až do rozpustenia návažiek (vyčírenie roztoku). Presná hodnota pH sa upraví koncentrovaným (1 M) roztokom NaOH. Objem roztoku sa doplní na 1 l. Roztok sa uskladňuje v chladničke pri teplote 4°C. Tesne pred použitím sa pridáva Triton X-100, ktorého výsledná koncentrácia je 1%. (Na 100 ml lyzujúceho roztoku sa pridá 1 ml Tritónu X-100).

### ***Elektroforetický roztok***

0,30 M NaOH  
0,01 M chelatón III

Elektroforetický roztok sa pripravuje vždy čerstvý v deň experimentu zo zásobných roztokov 5 M NaOH a 0,2 M Na<sub>2</sub>EDTA. Zásobné roztoky sa udržiavajú v chladničke. Na prípravu 1 l elektroforetického roztoku sa zlieva 60 ml 5 M NaOH, 5 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>EDTA. Objem sa doplní destilovanou vodou do 1 l.

### ***Neutralizačný roztok***

0,4 M Tris      pH = 7,5

Neutralizačný roztok sa pripravuje zo zásobného roztoku 1 M Tris riedením (2:3) destilovanou vodou. Na úpravu 1 l zásobného roztoku sa rozpusti 121,14 g Trisu v 700 ml destilovanej vody, hodnota pH zásobného roztoku sa upravuje 1 M HCl, po úprave pH sa objem doplní do 1 l. Zásobný roztok sa uchováva v chladničke.

### **Tlmivý roztok pre reparačné enzýmy na detekciu oxidovaných poškodení (endo pufor)**

0.04 M Hepes  
0.10 M chlorid draselný  
0.50 mM EDTA (kyslá forma)  
0.20 mg/ml boviný sérový albumín (BSA)  
pH = 8

Pripravuje sa 10x konc. roztok bez BSA, ktorého pH sa upravuje kryštalickým KOH. Koncentrát sa uchováva v mrazničke pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na pracovnú koncentráciu sa riedi v pomere 1:10. Nariedený sa uchováva v chladničke. Pre riedenie enzýmov (**iba!**) sa tesne pred použitím pridáva BSA.

## **6. Prístroje a pomocné zariadenia**

### **Prístroje**

- centrifuga (do 3 000 ot/min.)
- termostat ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ )
- mikrovlnná rúra
- analytické váhy
- pH meter
- vodný kúpeľ v rozpätí  $37 - 60^{\circ}\text{C}$
- zdroj napätia do 30 V
- elektroforetický box
- fluorescenčný mikroskop
- digitálna kamera
- software pre obrazovú analýzu
- počítač

### **Pomocné zariadenia**

- kyvety pre cytológiu
- krycie sklíčka 22x22 mm, no. 1
- podložné sklíčka so zdrsneným okrajom (pre popis vzorky)
- automatické pipety (20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ )
- špičky
- krabice na histologické preparáty
- laboratórne tácky
- laboratórne sklo a plast
- plynové kahany
- germicidní žiarivky
- výveva
- chladnička ( $4 \text{ až } 10^{\circ}\text{C}$ )
- mraznička (od  $-20^{\circ}\text{C}$ )

## **7. Pracovný postup**

### **Príprava sklíčok pre SCGE**

#### ***a) odmasťovanie sklíčok***

Podložné mikroskopické sklíčka sa opláchnu v destilovanej vode, usušia sa a namočia do kyvety s 96% etanolom. Sklíčka sa po 15 min. postupne vyberajú



pinzetou a opaľujú nad plameňom. Po vysušení sa ukladajú na tácku s filtračným papierom. Takto odmastené sklička sa používajú na potiahnutie agarózou (zdrsnenie skličok). Prvá vrstva agarózy slúži na lepšie prichytenie gélu.

### ***b) pot'ahovanie skličok***

Pripraví sa 1% roztok NMP agarózy v **destilovanej vode (!)**. Agaróza sa rozvarí v mikrovlnnej rúre. Homogénny roztok sa udržiava vo vodnom kúpeli pri teplote 56-58°C. Do tohto roztoku sa postupne po jednom namáčajú odmastené mikroskopické sklička. Povyťahnutú sklička z agarózy musí byť celá plocha sklička súvisle pokrytá agarózou. Spodná plocha sklička sa utrie. Takto potiahnuté sklička sa ukladajú na tácky s filtračným papierom. Sklička sa sušia pri 50°C 1 h alebo pri izbovej teplote cez noc. Po vysušení sa sklička môžu skladovať v krabičkách pre cytológiu.

### ***c) príprava spodných agarózových gélov***

Pripraví sa 1% roztok NMP agarózy v tlmivom fosfátovom pufri (**PBS, bez  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  iónov!**). NMP agaróza sa rozvarí v mikrovlnnej rúre a schladí na 56 - 58°C vo vodnom kúpeli. Na potiahnutú sklička sa napipetuje 100  $\mu\text{l}$  NMP agarózy a kvapka sa prikryje krycím sklíčkom tak, aby nevznikali bubliny. Na jednom sklíčku môžu byť 2 agarové gely. Agarový gel sa nechá stuhnúť v chladničke (5 - 10 min.). Takto pripravené sklička (spodné geli) sa skladujú vo vlhku, aby nedošlo k vysušeniu gélu. Sklička sa pripravujú v deň experimentu, prípadne deň pred pokusom. Na jednu vzorku sa používajú 3 sklička.

### ***d) príprava vrchných agarózových gélov***

V deň experimentu sa pripraví sa 0,75% roztok LMP agarózy. Agaróza v tlmivom fosfátovom pufri (**PBS, bez  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  iónov!**) sa rozvarí v mikrovlnnej rúre. Roztok agarózy sa udržiava vo vodnom kúpeli pri teplote 37 - 38°C.

## **Príprava biologického materiálu**

### **A. LYMFOCYTY**

#### ***a) Odber krvi***

- Dezinfikovať lakt'ovú jamku Septonexom alebo Jodisolom.
- Do striekačky s ihlou s ihlou na jedno použitie natiahnuť EDTA (koncentrácia EDTA je 1,6 mg/ml krvi) alebo použiť vakutainer s EDTA.
- Odobrať 5 ml krvi (minimum 1 ml).
- Ihlu na striekačke kryť sterilným krytom a striekačku s krvou **ihneď niekoľkokrát prevrátiť**, aby sa dobre premiešala s EDTA.
- Striekačku alebo vakutainer uložiť do chladničky pri teplote 4 - 10°C.

**Pozor! Krv nesmie zmrznúť ani skúmavka s krvou sa nesmie dotýkať priamo ľadu!!**

Každá osoba má vyplnený sprievodný list a kód s číslom, ktorý je do laboratória donesený spolu s krvou a ďalej archivovaný.

**b) Transport krvi**

Ak je treba krv transportovať z miesta odberu do laboratória, je treba použiť transportných chladených termonádob, kde je krv po dobu medzi odberom a spracovaním uchovávaná pri teplote 4 - 10°C.

**Opäť pozor! Krv nesmie zmrznúť ani skúmavka s krvou sa nesmie dotýkať priamo ľadu!!**

**c) Izolácia vitálnych periférnych lymfocytov z ľudskej venózne krvi.**

Podmienky zmrazenia a rozmrazenia lymfocytov

Princíp metódy

Separácia buniek podľa hustoty gradientovou centrifugáciou.

Použitý materiál

- 4 ml ľudskej krvi v EDTA (koncentrácia EDTA je 1,6 mg/ml krvi)
- médium RPMI 1640 (Sigma alebo Biocom)
- Lymphoprep (Nycomed)
- fetálne sérum (FCS) (Boicom)
- DMSO (Merck)
- rukavice
- stojany na: skúmavky, eppendorfký, falconky
- eppendorfký 1,5 ml
- sterilné skúmavky 10 ml
- sterilné skúmavky Falcon 50 ml
- Pasteur pipety
- sklené pipety - objemy 2, 5, 10 ml
- automatické nastaviteľné pipety
- polystyrénové krabice na zmrazovanie
- papierové krabice na uskladnenie v mraziacom boxe

**Tlmivý roztok PBSa (Dubbeco's PBSa)**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g (alebo Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O 2,89 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g

## Použité prístroje

laminárny box  
centrifúga  
mikroskop  
mraziaci box - 80°C  
vodný kúpeľ

## Metodický postup

- 4 ml krvi odobratej do skúmaviek s EDTA preniesieme do kadičky a zmiešame s rovnakým objemom média RPMI.
- Zmes krvi opatrne navrstvíme na 2,5 ml Lymphoprepu v 10 ml sterilnej skúmavke (na 8 ml zmesi krvi s médiom RPMI potrebujeme 2 skúmavky).
- Centrifugujeme 20 min. pri 1800 rpm a izbovej teplote. Pasteurovou pipetou odsajeme prstenec lymfocytov z oboch skúmaviek do 50 Falcon skúmavky. Spolu je to asi 7,5 ml lymfocytov.
- Pridáme RPMI médium do objemu 40 ml. Jemne premiešame.
- Centrifugujeme 10 min. pri 1600 rpm a izbovej teplote.
- Odsajeme supernatant a k sedimentu pridáme 5 ml RPMI média, lymfocyty rozsuspendujeme a spočítame v Bürkerovej komôrke. Potom odoberieme požadované množstvo lymfocytov pre Comet assay podľa počtu vzoriek  $1 \times 10^5$  ne gel.

## Zmrazovanie lymfocytov

- Po odobratí lymfocytos na Comet essay zvyšok zmesi centrifugujeme 10 min. pri 1600 rpm a izbovej teplote.
- Supernatant odsajeme a k sedimentu po kvapkách a za stáleho miešania pomaly pridávame zmrazovacie médium, 0.5 ml na 3 milióny lymfocytov.
- Zmes jemne prefúkame a dáme do eppendorfiiek, uzatvoríme a prelepíme parafilmom. Zmrazovacie médium: 10% DMSO vo fetálnom sére (FCS - fetal calf serum).
- Eppendorfky s lymfocytmi v zmrazovacom médiu dáme na 20-30 min. do ľadu a do chladničky. Potom ich uložíme do polystyrénovej krabice, ktorú vložíme ešte do jednej polystyrénovej krabice, dobre utesníme (lepiacou páskou) a uložíme do mrazničky na -80°C. Lymfocyty sa šetrne zmrazia a po 24 hodinách preložíme zmrazené lymfocyty do papierovej krabice, v ktorej budú uskladnené mrazničke.

## Rozmrazovanie lymfocytov

- Eppendorfku so zmrazenými lymfocytmi dáme do vodného kúpeľa 37°C. Po rozpustení preniesieme celý obsah do 50 ml Falconky a pridáme 10 ml média RPMI resuspendujeme.

- Určíme viabilitu lymfocytov trypanovou modrou. Pre Comet assay musí byť viabilita lymfocytov v rozmedzí 90-100%.
- Lymfocyty scentrifugujeme 10 min pri 1600 rpm a izbovej teplote.
- Supernatant odsajeme, k sedimentu pridáme 5 ml fosfátového roztoku, rozsuspendujeme, spočítame v Bürkerovej komôrke a požadované množstvo lymfocytov odoberieme na Comet assay.

### ***Izolovanie lymfocytov z krvi z prsta***

#### *Použitý materiál*

NaCl (M.h.= 58,45; 99,9%)  
 KCl (M.h.= 74,55; 98,5%)  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O (M.h.=358,141; 99%)  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (M.h.=136,086; 99%)  
 médium RPMI 1640  
 Histopaque 1077  
 eppendorfky  
 automatické pipety + špičky  
 stojany na eppendorfky  
 Pasteurove pipety  
 FCS

### **Tlmivý roztok PBSa (Dubbeco´s PBSa)**

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g (alebo Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O 2,89 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g

### **Použité prístroje**

Centrifúga

### **Metodický postup**

- Z prsta odoberieme 30µl krvi (možno použiť aj venóznou krv s anti-koagulantom) a pridáme do 1 ml RPMI + 10% FCS v 1,5 ml eppendorfke.
- Zmes dobre premiešame a necháme stáť na ľade asi 10 min.
- Potom ju opatrne podvrstváme 100µl Histopaque 1077, použitím automatickej pipety.
- Centrifugujeme pri 200 x g, 3 min, 4°C.
- Opatrne odoberieme lymfocyty (100µl), ktoré sa nachádzajú na rozhraní medzi RPMI a Histopaque (bledožltá priesvitná vrstva) a preniesieme ich do novej eppendorfky. Lymfocyty odoberáme vždy z dvoch eppendorfiek do jednej (t.j. v novej eppendorfke bude 200µl lymfocytov).
- Pridáme 800µl roztoku PBSa.

- Centrifugujeme pri 200 x g, 3 min, 4°C.
- Supernatant odoberieme pomocou 1 ml pasteurovej pipety. Takto izolované lymfocyty sú pripravené pre použitie v Comet assay, pričom množstvo buniek v jednej eppendorfke možno rozdeliť na 2 gely (t.j. pre paralelné stanovenie).

**Duthie, S. J., Ross, M., Collins, A. R.:** (1995) *Mutat. Res* 331: 55-64

## **Viabilita buniek**

### ***Princíp metódy***

Metóda je založená na schopnosti trypanovej modrej preniknúť do mŕtvych buniek, živé bunky zostanú nezafarbené.

### ***Materiál***

- automatické pipety, špičky
- eppendorfky
- NaCl (M.h.= 58,45; 99,9 %)
- KCl (M.h.= 74,55; 98,5 %)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (M.h.=358,141; 99 %)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (M.h.=136,086; 99 %)
- trypanová modrá (M.h.=960,8); 0,8 %-ný roztok trypanovej modrej v PBSa

PBSa (Dubbeco's PBSa)

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g (alebo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 2,89 g)

H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g

### **Použité prístroje**

- svetelný mikroskop
- Bürkerova komôrka

### **Metodický postup**

Suspenziu buniek (20µl) zmiešame v pomere 1:1 s 0,8%-ným roztokom trypanovej modrej v PBSa. Bunky spočítame v Bürkerovej komôrke a určíme ich viabilitu podľa vzorca:

$$V = 100 - \left( \frac{\text{počet mŕtvych buniek}}{\text{celkový počet buniek}} \right) \times 100 [\%]$$

pričom mŕtve bunky sú tie, do ktorých prenikla farbička, t.j. modré.

**UPOZORNENIE:** Po pridaní trypanovej modrej k suspenzii, treba bunky spočítať najneskôr do 3 min. (trypanová modrá je toxická)!

**Ekwal, B., Silano, V., Paganuzzi - Stamatii, A., Zucco:** Toxicity tests with mammalian cell culturas: Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects, 1990, 75-95.

## **B. TKANIVOVÉ KULTÚRY**

Bunky sa kultivujú v príslušnom kultivačnom médiu. Pred experimentom sa rozpasávajú na viaceré kultivačné nádoby podľa počtu testovaných látok a koncentrácií.

### *Testovanie genotoxicity*

Ľudské periférne lymfocyty alebo bunkové kultúry sa exponujú testovanou látkou v prítomnosti aj neprítomnosti externého metabolického aktivačného systému (MAS).

MAS sa pripravuje z mikrozomálnej frakcie (S9 frakcia) pečeneového homogenátu potkanov, ktorý je doplnený zmesou kofaktorov.

Pre každý experimentálny bod sa používajú kultúry:

- ***negatívna kontrola***
  - riedidlo (fyziol. roztok, DMSO)
  - metabol. aktivačný systém (MAS)
  - riedidlo + MAS
  - neovplyvnená kultúra
  
- ***pozitívna kontrola***
  - priamo pôsobiaci klastogén (MNNG, peroxid vodíka)
  - nepriamo pôsobiaci klastogén (benzo(a)pyrén) s MAS a bez MAS
  
- ***koncentrácia látky:*** použijú sa najmenej tri koncentrácie testovanej látky. Použité koncentrácie sa musia líšiť nejme o jeden rád. Najvyššia koncentrácia musí vykazovať maximálne 20% cytotoxicitu.
  
- ***doba expozície:*** bunky sa exponujú testovanou látkou krátkodobo - počas 1 - 3 h (pri použití S9 frakcie) alebo dlhodobo (24 h). V prípade peroxidu vodíka 5 min. Na ľade.

## Zpracovanie kultúr a príprava jednobunkovej suspenzie pre SCGE (comet assay)

### **Stabilizované bunkové kultúry**

Po ukončení ovplyvňovania sa bunky trypsinizujú (stabilizované bunkové kultúry), ich počet sa stanoví v Burkerovej komôrke. Bunky z jednotlivých vzoriek sa nariaďia tak, aby sa v 1 ml nachádzalo  $1,5 \times 10^5$  buniek. Z každej vzorky sa odoberie do eppendorfky 1 ml suspenzie. Vzorky sa centrifugujú 5 min. pri 1000 ot./min.

### **Poznámka!**

Počas manipulácie s bunkami treba robiť opatrne, treba sa vyhnúť prudkému pretrepávaniu buniek, otrasom (možnosť navodenia sekundárnych poškodení). Po stočení sa eppendorfky uložia do ľadu. Ďalšia manipulácia s bunkami s deje v bez priameho osvetlenia (v prítmí).

V prípade lymfocytov krok trypsinizácie odpadá. Ostatné kroky (riedenie) sú tie isté.

### **Fixácia buniek v agarózovom géli**

Vzorky sa sparcúvajú postupne. Z eppendorfky sa zleje supernatant, k peletu sa pridá 0,5 ml LMP agarózy (0,75%), ktorá bola pripravená pred ukončením ovplyvnenia, a suspenzia sa premieša, aby vznikla homogénna suspenzia. Aby sa zabránilo stuhnutiu agarózy, eppendorfka sa dá do vodného kúpeľa vyhriateho na 37°C. Z troch sklíčok so spodným gélom sa stiahnu krycie sklíčka a na každé sa napipetuje 85  $\mu$ l bunkovej suspenzie v agaróze. Po kvapnutí suspenzie sa kvapka okamžite prikryje krycím sklíčkom. Vytvorí sa druhá vrstva gélu. Vzorky sa na zdrsnenej ploche označia. Rozkvapkané vzorky sa dajú na laboratórnu tácku s navlhčeným filtračným papierom a uložia sa na chvíľu do chladu (3 - 5 min.), aby gel ztuhol.

### **Lýza buniek**

Po stuhnutí sa krycie sklíčka stiahnu z gélov a naukladajú do kyvety. Kyvety sa opatrne naplnia lyzujúcim roztokom schladeným na 4° C, do ktorého bol pridávaný krátko pred lýzou Triton X-100. Finálna koncentrácia Tritónu X-100 je 1% roztok (1 ml Tritónu X-100 do 100 ml lyzujúceho roztoku). Lýza prebieha v tme, pri 4°C, 60 min.

### **Alkalické odvíjanie DNA**

Sklíčka sa vyberú z lyzujúceho roztoku, nechajú chvíľu odkvapkať. Potom sa poukladajú na horizontálny elektroforetický box. Medzi sklíčkami nesmú zostať medzery. Prípadné voľné miesta na tanku sa doplnia prázdnyimi sklíčkami. Sklíčka sa ukladajú vždy čo najbližšie k anóde. Sklíčka sa zalejú

elektroforetickým pufrom, ktorý bol pripravený čerstvý v deň experimentu. Z elektroforetického boxu treba odstrániť všetky bubliny. Alkalické odvíjanie prebieha v tme, pri 4°C (chladnička alebo chladný box), 40 min.

### **Elektroforéza**

Elektroforéza prebieha v tom istom roztoku, v tme, pri 4° C, 30 min. Napätie je 25 V (0,7 - 1 V/cm) a prúd 0,3 A. Presné nastavenie prúdu sa dosiahne odobraním alebo pridávaním elektrolytu.

### **Neutralizácia**

Po ukončení elektroforézy sa sklíčka vyberú z tanku a nechajú sa odkvapkať. Potom sa nakladajú do kyviet a opatrne zalejú neutralizačným roztokom. Sklíčka sa neutralizujú 3x5 minút.

### **Farbenie preparátov**

Po poslednej neutralizácii sa nechajú sklíčka odkvapkať. Sklíčka sa potom farbía fluorescenčnou farbičkou - etídium bromidom. Na každé sklíčko sa kvapne 20 µl EtBr (10µg/ml). Sklíčko sa prikryje krycím sklíčkom, uložia na tácku s vlhkým filtračným papierom a zakryjú alobalom. Preparáty sa môžu hneď vyhodnocovať. Lepšie je hodnotiť zafarbené preparáty na druhý deň kvôli nižšiemu pozadiu.

### **Vysušenie preparátov**

Preparáty sa môžu po neutralizácii vysušiť a uskladniť v krabiciach pre histologické preparáty.

### **Obnovenie preparátov**

Vysušené preparáty sa pred farbením potiahnu novou vrstvou LMP agarózy (0,75%). Po stuhnutí gélu sa zafarbía EtBr ako v prípade čerstvých preparátov.

### **Analýza preparátov**

Preparáty sa hodnotia vo fluorescenčnom mikroskope pri zväčšení 25x alebo 40x. Na zafarbenie preparátov sa môžu použiť rôzne fluorescenčné farbičky s afinitou k DNA. Každý fluorochróm vyžaduje vlastné excitačné a emisné filtre.

#### **a) Vizuálne hodnotenie preparátov**

Pri vizuálnom hodnotení sa analyzuje 100 komet na jeden gel (celkovo 300 hodnôt). Kométy sú zaraďujú do 5 kategórii podľa tvaru kométy. Jednotlivé kategórie komet sú na obr. 1.



## b) Hodnotenie preparátov obrazovou analýzou

Existujú viaceré systémy pre obrazovú analýzu. Jedným z nich je aj Kome analysis system, vyvinutý Kinetic Imaging, Ltd. (Liverpool, UK). Pre obrazovú analýzu je potrebná monochromatická CCD kamera a počítač. Pri tejto analýze sa hodnotí min. 25-50 komét na sklíčko. Ako parameter poškodenia sa najčastejšie používa:

**“% DNA v chvoste kométy” (%tail DNA)**

### Grafické spracovanie dát

Dáta, ktoré sa získali z analýzy preparátov, sa môžu vyhodnotiť formou histogramov alebo priemernou hodnotou.

*i) histogramy* - reprezentujú distribúciu poškodenia v analyzovanej populácii buniek. Pri vizuálnom hodnotení, histogramy reprezentujú počet komét v jednotlivých kategóriách (triedach) poškodenia (0-4). Zaradovanie komét do tried závisí od dĺžky chvosta a intenzity jeho zafarbenia (obr. 1). Pri obrazovej analýze sú kométy rozdelené do kategórií podľa % DNA v chvoste.

*ii) dávka-efekt* - poškodenie je vyjadrené ako priemerná hodnota. Pri obrazovej analýze daný program vypočítava priemernú hodnotu automaticky z analyzovaných dát. Pri vizuálnom hodnotení sa poškodenie vyjadruje v arbitrárnych jednotkách nasledovne: jednotlivé 'kométy' sa zaradujú do tried poškodenia podľa dĺžky chvosta a jeho intenzity (obr. 1). priemerná hodnota poškodenia sa vypočítava podľa vzorca:

$$P = \Sigma (0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d) + (4 \times e)$$

kde:

**P** = priemerné poškodenie

**0** = kategória poškodenia 0

**1** = kategória poškodenia 1

**2** = kategória poškodenia 2

**3** = kategória poškodenia 3

**4** = kategória poškodenia 4

**a** = počet buniek kategórie 0

**b** = počet buniek kategórie 1

**c** = počet buniek kategórie 2

**d** = počet buniek kategórie 3

**e** = počet buniek kategórie 4

Extrémne hodnoty poškodenia pri vizuálnom hodnotení sú : 0 - žiadne poškodenie alebo 400 - všetky kométy patria do triedy 4.

Na štatistické spracovanie údajov sa využíva *t*-test, pri epidemiologických štúdiách štandardné štatistické programy, napr. ANOVA.

## **C. MODIFIKOVANÁ JEDNOBUNKOVÁ GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA**

### **Detekcia oxidačných poškodení DNA s využitím reparačných enzýmov**

Schéma experimentu je tá istá ako už bolo popísané až po krok **lýzy**.

Sklíčka sa po lýze vyberú z lyzujúceho roztoku a nechajú sa odkvapkať. Naukladajú sa do kyviet a 2x po 10 min. sa premývajú endo pufrom (bez BSA). Po poslednom premytí sa opäť nechajú odkvapkať. Na agarózové gely sa kvapkajú reparačné enzýmy, ktoré sa nariesia na pracovnú koncentráciu tesne pred aplikáciou v endo pufri s BSA. Pri zakúpení enzýmov spôsob riedenia býva priložený. Oxidačné poškodenia pyrimidínov sa detekujú endonukleázou III (endo III) , oxidačné poškodenia purínov - formamidopyrimidín DNA glykozyázou (Fpg proteín).

### **Inkubácie s reparačnými enzýmami:**

Na príslušné agarózové gély (3 paralelky/enzým/vzorka) sa napipetuje 40 µl pracovnej koncentrácie enzýmu, gél sa prikryje krycím sklíčkom. Sklíčka sa uložia do uzatvoriteľnej nádoby s navlhčeným filtračným papierom a dajú sa inkubovať s **endo III 45 min** a **Fpg 30 min** do termostatu na 37°C. Po ukončení inkubácie sa krycie sklíčka stiahnu a preparáty sa uložia na elektroforetického boxu.

Ďalšie kroky nasledujú ako už bolo popísané - alkalické odvíjanie, elektroforéza, neutralizácia, farbenie, hodnotenie.

**Collins, A. R., Dušinská, M., Gedik, C. M., Stetina, R.:** Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker? *Environ Health Perspect* 104, 1996, 465-469

### **Interný štandard**

V epidemiologických štúdiách sa odporúča používať tzv. interný štandard (IS), ktorý slúži na kontrolu "stability" podmienok analýzy všetkých vzoriek počas dlhodobých (mesiace, roky) štúdií alebo opakovanom biomonitoringu v pravidelných časových intervaloch. Ako IS sa môžu používať zmrazené lymfocyty v aliquotach z jedného jedinca alebo stabilizovaná bunková línia. V celej štúdií sa používajú v pravidelných intervaloch tie isté lymfocyty/bunky. IS by sa mal robiť minimálne raz do týždňa ak sú odbery dlhodobé.

**De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Vande PA, Kirsch-Volders M. (2000)**  
Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis.  
Mutat Res., 469,181-97

## **9. Validácia metódy**

Používa sa štandardná metóda odvodená z pôvodnej metódy zavedenej Singhom et al. (1988). Metóda sa používa viac ako 10 rokov v laboratóriách na celom svete. Jej validita bola overovaná medzilaboratórnymi porovnaniami ako i výmenou a analýzou kódovaných vzoriek. V roku 1999 na medzinárodnom podujatí: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP), Comet Assay Working Group 1999 vo Washingtone, vypracovala skupina expertov pre comet assay návrh pracovného postupu pre SCGE/comet assay pre genetickú toxikológiu na jej zaradenie medzi štandardné metódy OECD.

Od roku 1999, po Comet Assay Workshope v Smoleniciach, Slovenská republika, existuje webová stránka Comet Assay Interest Group:

**[www.cometassay.com](http://www.cometassay.com)**

Prístup na túto web stránku je voľný, každý záujemca má možnosť diskutovať svoje problémy *ad hoc* prostredníctvom e-mailu.

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 354; 267 082 378; fax: 267 082 378;  
e-mail: [apastor@szu.cz](mailto:apastor@szu.cz); [mcerna@szu.cz](mailto:mcerna@szu.cz)

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### **6. Amesův miskový test (plate incorporation assay)**

**Původ metody:** Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113, 173 - 215, 1983

**Zpracoval:** MUDr. Anna Pastorková, CSc.; Prof. MUDr. Milena Černá, DrSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje stanovit mutagenní aktivitu individuálních chemických látek i komplexních směsí (voda, vzduch, moč, aj.) pomocí bakteriálních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium*.

## **2. Definice**

Test je založen na indukci zpětných mutací (reversí) u původně auxotrofních indikátorových bakteriálních kmenů, které ke svému růstu vyžadují externí přídavek histidinu. Revertanty (bakteriální buňky změněné mutací) jsou pak schopny růstu i v nepřítomnosti histidinu.

## **3. Princip metody**

Používané indikátorové kmeny se vyznačují definovanou změnou v histidinovém operonu syntetizujícím histidin. Po expozici buněk individuální chemické látky nebo vhodně upravené komplexní směsi prostředí (sorpce, extrakce, koncentrace, filtrace apod.) ve zvolených dávkách se mutované buňky detekují růstem na miskách s minimálním obsahem histidinu, na nichž běžné buňky vytvářejí pouze tzv. pozadí. K modelování savčího metabolického systému se používá aktivační směs (S9-směs) obsahující enzymy a jaterní homogenát.

## **4. Bezpečnost práce**

Metodika vyžaduje práci s mutageny a karcinogeny (např. benzo(a)pyren, 1-nitropyren, cyklofosfamid).

Je třeba:

- dodržovat zásady běžné pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři,
- používat pomůcky osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky,
- dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí - při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami (mutageny, karcinogeny), s infekcí, včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie, spotřební materiál, činidla**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

### **Základní chemikálie a kultivační půdy:**

dimethylsulfoxid (DMSO)  
etanol 96%

sterilní deionizovaná voda

$K_2HPO_4$

$KH_2PO_4$

$(NH_4)_2SO_4$

citronan sodný

***Kultivační média:***

Nutrient broth Oxoid II (pro přípravu tekutého kultivačního média)

Noble agar Difco (pro přípravu vrchního agaru)

Agar bacteriological Oxoid 1 (pro přípravu minimálního agaru)

***Antibiotika pro přípravu roztoků přidávaných do kultivačního média:***

Ampicilin sodná sůl (např. Merck)

Tetracyklin substance

Kanamycin monosulfát (např. Sigma)

***Referenční mutageny:***

Daunomycin hydrochlorid, m.v. 563,99 (např. Sigma)

Azid sodný (např. Fluka, Merck)

2-Aminofluoren

2-Aminoanthracen, m.v. 193,2 (např. Sigma)

1-Nitropyren, m.v. 247,26 (např. Aldrich)

***Mutageny pro optimalizaci S9:***

Benzo(a)pyren, (např. Koch-Light, Aldrich)

9,10-dimetylbenzantracen, m.v. 256,3 (např. Sigma)

2-Nitrofluoren, m.v. 211,22 (např. Aldrich)

event. další dle předpokládaného charakteru testovaných látek či směsí.

***Chemikálie pro přípravu roztoku kofaktorů pro metabolickou aktivaci (směs S9):***

$MgCl_2$

KCl

$Na_2HPO_4 + 2H_2O$

$NaH_2PO_4 + 2H_2O$

NADP ( $\beta$ -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, Monosodium Salt)

G-6-P (glucoso-6-phosphate)

**Biologické faktory:**

***Indikátorové kmeny Salmonella typhimurium.***

Jaterní homogenát S9 připravený nejčastěji z jater krysích samců po indukci enzymů (např. Arochlorem, Delorem).

## **Roztoky:**

### ***Roztok histidinu a biotinu*** (0,5 mM) (dále HisBio):

L-histidin (0,078 g) a D-biotin (0,122 g) rozpustit v 1000 ml deionizované vody, rozplnit po 200 ml do Erlenmeyerových buněk a sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C. Skladovat v chladničce max. 3 měsíce

### ***Roztoky antibiotik:*** (lze uchovávat v chladničce max. 4 týdny)

Ampicilin o koncentraci 2,5 mg v 1 ml sterilní deionizované vody

Tetracyklin o koncentraci 0,625 mg v 1 ml 0,02N HCl

Kanamycin o koncentraci 2,5 mg v 1 ml sterilní deionizované vody

### ***Roztoky referenčních mutagenů:***

- Daunomycin - pro kontrolu reakce kmene TA98 bez metabolické aktivace. Aplikace v množství 1 - 10 µg/misku, vždy v objemu 100 µl/misku.

- Azid sodný - pro kontrolu kmene TA100 bez metabolické aktivace. Aplikace v množství 1 - 3 µg/misku, vždy v objemu 100 µl/misku

- 1-nitropyren - pro kontrolu kmenů řady YG bez metabolické aktivace. Aplikace 0,5 µg/misku, vždy v objemu 100 µl/misku.

- 2-aminofluoren - pro kontrolu funkčnosti metabolické aktivace. Aplikace 5 µg/misku (pro kmeny řady TA) nebo 0,1 µg/misku (pro kmeny řady YG), vždy v objemu 100 µl/misku.

- 2-aminoantracen - pro kontrolu funkčnosti metabolické aktivace. Aplikace 0,5 µg/misku, vždy v objemu 100 µl/misku.

### ***Fosfátový pufr (0,2 M PO<sub>4</sub> pH 7,4)*** pro metabolickou aktivaci:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O (17,4 g) a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O (44,4 g) rozpustit v 1000 ml deionizované vody. Upravit pH na 7,4. Sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C. Skladovat při pokojové teplotě.

### ***Roztok MgCl<sub>2</sub>/KCl*** pro metabolickou aktivaci:

KCl (61,5 g) a MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (40,7 g) rozpustit v 500 ml deionizované vody. Rozplnit po 200 ml do Erlenmeyerových buněk a sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C. Skladovat v chladničce max. 2 měsíce

### ***Směs S9 pro metabolickou aktivaci na objem 10 ml:***

NADP, m.v. 765,5 = 30,64 mg

G-6-P, m.v. 304,1 = 15,20 mg

(pozn.: v případě jiné m.v. nutno navážku přepočítat)

voda\* = 4,61 ml

MgCl<sub>2</sub>/KCl = 0,20 ml

fosfátový pufr (0,2 M = 5,00 ml)

jaterní homogenát\* v objemu 0,19 ml.

\* Objem jaterního homogenátu je pro každou šarži stanoven na základě výsledku optimalizace. Spolu s vodou představují objem 4,8 ml. Při vyšším či nižším objemu homogenátu se mění i objem vody.

## **Média**

### ***Vrchní agar:***

Do 1000 ml deionizované vody přidat 6,4 g Noble agar Difco a 5 g NaCl. Agar rozpustit v horké páře, upravit pH na 7,0 - 7,2, rozplnit do lahví Pyrex po 200 ml, sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C. Skladovat v chladničce až 2 měsíce.

### ***Tekuté kultivační médium:***

V 1000 ml deionizované vody rozpustit 25 g Nutrient Oxoid Broth II. Upravit pH na  $7,5 \pm 0,2$  (použít 2% NaOH nebo 3% HCl). Rozplnit do lahví Pyrex po 200 ml, sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C. Skladovat v chladničce až 2 měsíce.

### ***Minimální médium (VBME):***

#### *Roztok I (sole):*

Navážit  $K_2HPO_4$  (25,0 g),  $Na(NH_4)_2SO_4 + 4H_2O$  (8,75 g), kys. citronovou (5,0 g) a  $MgSO_4 + 7H_2O$  (0,5 g), objem doplnit teplou deionizovanou vodou do 50 ml. Sterilizovat v autoklávu 20 min. při 121°C.

#### *Roztok II (agar):*

Agar Oxoid Bacteriological 1 (20,0 g) přidat k 910 ml deionizované vody a rozpustit v horké páře. Upravit pH na 7,0, sterilizovat 15 min. při 121°C, ochladit na teplotu pod 60°C.

Přidat: 20 ml roztoku solí, 40 ml 50% glukózy.

Vylévat do sterilních Petriho misek. Misky skladovat v chladničce.

### ***Spotřební materiál:***

Sterilní laboratorní sklo (event. vhodný plast) - zkumavky, pipety atd.

Petriho misky

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

analytické váhy

mikropipety elektronické a digitální

dávkovač Eppendorf Multipette event. Nichiryo

třepací vodní lázeň

vodní lázeň

vodní termostat

přístroj na počítání bakteriálních kolonií („Counter/Analyser model 982 B“)



mikrovlnná trouba  
chladnička (4 - 10°C)  
mraznička (- 18° - 20°C)  
mrazící box (od - 60°C)  
laboratorní třepačka (vortex)  
germicidní zářivka  
plynový kahan  
inokulační kličky

## **7. Pracovní postupy**

### ***Obecně***

Ověření vlastností kmenů *Salmonella typhimurium*:

K testování lze použít pouze kmeny s ověřenými vlastnostmi. Testuje se:

Přítomnost rfa mutace citlivostí ke krystalové violeti (0,1 ml bakteriální kultury rozetřít na misku s živným agarem, na povrch misky vložit 5 mm sterilní disk filtračního papíru, na který se umístí 10 µl vodného roztoku krystalové violeti o koncentraci 1 mg/ml. Přítomnost rfa mutace se projeví inhibiční zónou kolem disku po celonoční inkubaci při 37°C).

Přítomnost delece *uvrB* (0,1 ml bakteriální kultury rozetřít na misku s živným agarem, polovinu misky zakrýt alobalem, misku neuzavřenou víčkem vystavit UV světlu o výkonu 121 mW/cm<sup>2</sup>, vlnové délky 254 nm ve vzdálenosti 33 cm po dobu 8 vteřin. Přítomnost delece *uvrB* se projeví absencí růstu na ozářené části misky po celonoční inkubaci při 37°C).

Rezistence k příslušným antibiotikům (0,1 ml bakteriální kultury rozetřít na misku s živným agarem, několika minutách umístit na povrch misky komerční disk příslušného antibiotika. Přítomnost plasmidu s resistencí na antibiotikum se projeví absencí inhibice růstu kolem disku po celonoční inkubaci při 37°C).

### ***Příprava zásobních kultur a jejich uchování:***

Bakteriální buňky jsou pasážovány přes misky s minimálním médiem obohaceným histidinem a biotinem a příslušným antibiotikem. Izolované kolonie se přenesou do tekutého média Nutrient Broth Oxoid No.II s přídavkem příslušných antibiotik. malé množství kultury se použije pro ověření vlastností. Zásobní kultura se připraví smícháním 1 ml narostlé kultury s 0,09 ml DMSO, rozplní do sterilních mikrozkmavek, postupně zmrazí a umístí v mrazničce při -80°C. Pro přípravu celonoční pracovní kultury se použije vždy nová mikrozkmavka se zásobní kulturou.

### **Postup práce při vlastním experimentu**

#### ***Příprava - den před experimentem:***

- Spočítat potřebné množství misek, vrchního agaru a roztoku HisBio (vrchní agar: 2ml/misku, HisBio: 10ml/100ml vrchního agaru)
- Misky s minimálním médiem vytemperovat na pokojovou teplotu a popsat (lihovými popisovači na boční stranu misky): označit číslo vzorku, dávku, kmen, metabolická aktivace:
  - misky pro experiment - minimálně po 2 miskách
  - kontrolní misky (s rozpouštědlem) po 3 miskách
  - misky pro pozitivní kontrolu (s referenčním mutagenem) po 3 miskách
  - kontrolní misky (bez rozpouštědla) po 2 miskách
- Spočítat množství S9 směs (0,5ml/misku) a podle tabulky navážit potřebné množství látek NADP a G-6-P.
- Naočkovat vybrané kmeny *S.typhimurium* do tekutého média Nutrient Broth Oxoid No.II s přidavkem příslušných antibiotik. Pro kmeny TA97, TA98 a TA100 se přidává roztok ampicilinu v množství 100 µl/10 ml média, pro kmeny YG 1020, 1021, 1024, 1025, 1026, 1029 roztoky ampicilinu a tetracyklinu (každý v množství 100 µl/10 ml média) a pro kmeny YG1041 a 1042 roztoky ampicilinu a kanamycinu (každý v množství 100 µl/10 ml média). Kultivovat v Erlenmeyerových baňkách pokrytých alobalem, event. plastových kultivačních nádobkách, v třepací vodní lázni při 37±1°C a cca 100 kmitech za min. Spotřeba narostlé kultury je 0,1 ml/misku. Délka kultivace je 16 hod. (přes noc), u YG kmenů může být delší, až 24 hod.
- Připravit roztoky referenčních mutagenů .
- Vytemperovat vzorky na pokojovou teplotu a naředit jednotlivé dávky testovaných vzorků tak, aby každá dávka byla aplikována v jednotném objemu 100 µl/misku. Naředěné vzorky, řádně označené, uložit do chladničky. (Vzorky lze ředit i bezprostředně před testováním.)
- Zkontrolovat, zda je dostatek sterilních špiček, led v mrazničce.
- Sterilizovat dávkovače - parami persterilu, přes noc nechat odvětrat pod UV lampou.
- Uklidit box s jeho následným vysvícením UV lampou - přes noc.

### ***Den experimentu - příprava***

- Vytemperovat vodní lázeň na 45±1°C
- Vizuálně zkontrolovat nárůst bakteriální kultury (zákal kultivačního média) a umístit ji do chladničky.
- Vyndat z chladničky předem připravené vzorky a vytemperovat při pokojové teplotě.
- Připravit směs S9: K naváženým substancím (NADP a G-6-P) přidávat postupně tekuté složky, nejdříve vodu. Po jejich rozpuštění směs přefiltrovat přes sterilní milliporový filtr (Millex HV 0,45µm) a po filtraci sterilně přidat jaterní homogenát. Směs musí být stále umístěna v lázni s ledovou tříští.

- V mikrovlnné troubě dokonale rozehrát vrchní agar. Po mírném ochlazení (na cca 60°C) k agaru přidat 0,5mM roztok HisBio (10ml na 100 ml vrchní agaru) a umístit do vytemperované vodní lázně.

### ***Den experimentu - vlastní experiment***

- Do sterilních zkumavek ve vodní lázni nadávkovat 2 ml vrchního agaru s HisBio
- Přidat 100µl bakteriální kultury po celonoční kultivaci
- Přidat 100µl vzorku příslušné koncentrace
- Přidat 0,5 ml fosfátového pufru nebo S9 směsi (misky označené -S9 nebo +S9).
- Po promíchání na vortexu obsah zkumavek převrstvit na misky s minimálním médiem. Agar se rozlévá tak, aby povrch misky byl hladký.

**POZOR!** S9 směs se teplem rychle inaktivuje, nesmí být ve vodní lázni dlouho (jen desítky vteřin)! proto se přidává naposledy.

- Ke kontrolním miskám přidat místo testovaného vzorku 100 µl rozpouštědla (obvykle DMSO). Další negativní kontroly jsou bez rozpouštědla, obsahují vrchní agar s HisBio, bakteriální kulturu, S9 směs nebo pufr.
- K pozitivním kontrolám přidat příslušné referenční mutageny, v objemu 100µl/zkumavku.
- Po zatuhnutí (cca 20 minut) misky obrátit dnem vzhůru a umístit na 72 hod do termostatu při 37±1°C.
- Při zahájení a ukončení práce provést kontrolu sterility vrchního agaru, S9 směsi a pufru.
- Nástavce do dávkovačů po použití umýt kartáčkem pod tekoucí vodou. Po oschnutí vypláchnout etanolem a suché umístit do par persterilu (do uzavřené skleněné dózy s několika kapkami persterilu).
- Použité sklo odkládat do roztoku neodisher GK (konc. 2 - 5 g/l vody). Použitý plast a spalitelný materiál ukládat v označených plastových obalech na vyhrazené místo. Nepoužité zbytky vzorků (mutagenů) přenést do určené nádoby s kyselinou chromsírovou.

### ***Odečítání výsledků kultivace (po 72 hod.)***

Po 72 hodinách kultivace se misky vyjmou z termostatu a spočtou se bakteriální kolonie na miskách. Současně se zkontroluje růst pozadí, aby se vyloučila možnost falešné positivity v důsledku toxického účinku testované látky. Kolonie se počítají nejlépe automaticky pomocí počítače kolonií (např. Colony analyzer/counter model 982B nebo jiného zařízení tohoto typu). Lze zvolit i ruční počítání nebo jiný ověřený způsob.

## ***Zpracování a archivace výsledků***

Odečtené počty kolonií je vhodné evidovat a archivovat v databázích. K tomuto účelu byla vytvořena např. databáze GeneTox Manager (U.S.EPA) obsahující i vhodné statistické modely pro další zpracování výsledků jednotlivých vzorků.

### ***Výpočet***

U testovaných vzorků se hodnotí nárůst počtu revertant oproti kontrole a zejména dávková závislost mutagenního efektu. Za mutagenní je považován vzorek s nejméně dvojnásobným nárůstem revertant oproti kontrole (kvalitativní hodnocení). Dávková závislost - počet revertant/jednotku dávky - je počítána převážně podle Bernsteinova modelu lineární regrese v databázi GeneTox Manager (US EPA). Je-li zjištěna statisticky významná závislost počtu revertant na dávce, je výsledek udáván jako maximální mutagenní potence dané látky či směsi (počet revertant na zvolenou jednotku hmotnosti nebo objemu).

## **8. Rušivé vlivy**

Stabilita a standardnost růstu bakteriálních kmenů,  
možnost kontaminace vzorků, médií, laboratorního nádobí,  
nepřesnost používaných odměrných nádob, pipet,  
nepřesnost používaných přístrojů,  
lidský faktor.

## **9. Validace metody**

Používá se standardní metoda odvozená od mezinárodně normované, která je opakovaně ověřována mezilaboratorním porovnáváním a používána celosvětově již po cca 30 let.

### ***Vyjadřování nejistot měření***

Ke stanovení nejistot lze využít regulačních diagramů - odezvy jednotlivých kmenů na referenční mutageny.

## **10. Kontrola kvality**

Interní: Úroveň spontánních revertant a odezva indikátorových kmenů na referenční mutageny (v rámci každého experimentu). Kontrola resistance na antibiotika (přítomnost plasmidů), rfa mutace, uvrB mutace. Testování referenčních vzorků (Standard Reference Material 1649, Urban Dust/Organic).

Externí:

Okružní vzorky v rámci mezilaboratorních kontrol.

**Literatura:**

**Maron D.M., Ames B.N.:** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 1983, 173 - 215

**Bernstein L., Kaldor J., McCann J., Pike M.C.:** An Empirical Approach to the Statistical Analysis of Mutagenesis Data from the Salmonella Test. *Mutat. Res.* 97, 1982, 267 - 281

**Stead, A.G., Hasselblad, V., Creason, J.P., Claxton, L.D.:** Modeling the Ames Test. *Mutat. Res.* 85, 1981, 13 - 27

**Claxton, L.D., Creason, J., Nader, J.A., Poteat, W., Orr, J.:** GeneTox manager for bacterial mutagenicity assays: a personal computer and minicomputer system. *Mutat. Res.*, 342, 1995, 87-94

**ICH (International Commission on Harmonization),** Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity tests for Pharmaceuticals, Int. Comm. on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, 1995

**OECD:** Guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD, Paris, France, 1997.

**Mortelmans, K., Zeiger, E.:** The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455, 2000, 29-60

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 354; 267 082 378; fax: 267 082 378;  
e-mail: [apastor@szu.cz](mailto:apastor@szu.cz); [mcerna@szu.cz](mailto:mcerna@szu.cz)

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### 7. Mikrosuspenzní test dle Kado

Původ metody: Kado N.Y., D: Langley, E. Eisenstadt: A simple modification of the Salmonella liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in humane urine, Mutat Res,121,25-32,1983

Zpracoval: MUDr. Anna Pastorková, CSc.  
Prof. MUDr. Milena Černá, DrSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje stanovit mutagenní aktivitu individuálních chemických látek i komplexních směsí (voda, vzduch, moč, aj.) pomocí bakteriálních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium*. V porovnání s klasickým Amesovým testem se využívá zejména v případech, kdy je omezené množství vzorku a kde se předpokládá nízká koncentrace látek s mutagenními účinky. Vhodný je zejména pro stanovení mutagenity komunálního ovzduší, ovzduší odebraného osobními odběrovými soupravami, pitné vody a moče.

## **2. Definice**

Test je založen na indukci zpětných mutací (reverzí) u původně auxotrofních indikátorových bakteriálních kmenů, které ke svému růstu vyžadují externí přísávek histidinu. Revertanty (bakteriální buňky změněné mutací) jsou pak schopny růstu i v nepřítomnosti histidinu.

Mikrosuspenní test (Kado test) je modifikace standardního Amesova testu, náročnější na provedení. Zvyšuje citlivost metody a snižuje spotřebu testovaného vzorku, chemikálií a jaterního homogenátu.

## **3. Princip metody**

Základní údaje viz Amesův miskový test.

Stejně jako u standardního Amesova testu se zjišťuje nárůst zpětných mutací (revertant) v dávkové závislosti. Zvýšení citlivosti testu dle Kado spočívá v preinkubaci testované látky, zkoncentrované do malého objemu rozpouštědla, se zkoncentrovanou kulturou *Salmonella typhimurium* a aktivační směsí (směsí S9), která se používá k modelování savčího metabolického systému.

## **4. Bezpečnost práce**

Metodika vyžaduje práci s mutageny a karcinogeny (např. benzo(a)pyren, 1-nitropyren, cyklofosfamid).

Je třeba:

Dodržovat zásady běžné pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři,

Používat pomůcky osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky,

Dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí - při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami (mutageny, karcinogeny), s infekcí, včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie, spotřební materiál, činidla, přístroje a pomocná zařízení**

jsou shodná s požadavky na provádění Amesova miskového testu.

### ***Požadavky specifické pro mikrosuspenzní test dle Kado:***

parafilm na přikrytí stojanu se zkumavkami  
pipeta na dávkování malých objemů (5  $\mu$ l)  
chlazená centrifuga (10 000 otáček/min)  
stojan k odpařování obsahu zkumavek pod dusíkem

## **6. Pracovní postup**

Při veškeré práci je třeba dodržovat zásady sterility a ochrany zdraví!

### ***Příprava vzorků***

- Vysterilizovat stojan pro odpařování zkumavek pod dusíkem parami persterilu (min. 2 hod) s následným odvětráním pod UV lampou (cca 0,5 hod).
- Sterilní zkumavky se popíší (číslo vzorku, koncentrace, kmen) a do každé se odpipetuje 5 $\mu$ l DMSO.
- Extrakty vzorků v kalibrovaných zábrusových zkumavkách se vytemperují při pokojové teplotě (chráněné před světlem), zkontroluje se objem (popřípadě se doplní příslušným rozpouštědlem) a vzorek se promíchá.
- Do zkumavky s 5 $\mu$ l DMSO se přidá množství extraktu odpovídající požadované koncentraci testovaného vzorku. Jedná se o extrakty dosud nepřevedené do DMSO - v dichlormetanu, metanolu, acetonu - obvykle se rychle odpařují při pokojové teplotě. Je třeba pracovat rychle, při zapnutém odsávání, extrakty musí být ve zkumavkách se zábrusovou zátkou. Nejnižší koncentrace vzorku je pipetována v objemu minimálně 20 $\mu$ l.
- Zkumavky s připravenými koncentracemi testovaných vzorků se po protřepání umístí do vodní lázně cca 37°C pod proud dusíku. Extrakt vzorku se po odpaření původního rozpouštědla převede do 5 $\mu$ l DMSO. Zkumavky se překryjí parafilmem a umístí až do doby zpracování v mrazničce.

**Pozn.:** Při převádění rozpouštědel se vzorek nesmí odpařit úplně dosucha, musí tam zůstat 5 $\mu$ l!! Zvláště pozor dávat při odpařování dichlormetanu, je pro indikátorové kmeny toxický již při nízkých koncentracích !!

### ***Den před vlastním experimentem:***

Misky s minimálním médiem vytemperovat na pokojovou teplotu a popsat (lihovými popisovači na boční stranu misky): číslo vzorku, dávka, kmen

misky pro experiment - minimálně po 2 miskách (lépe 3)

kontrolní misky (s rozpouštědlem) po 3 miskách

misky pro pozitivní kontrolu (s referenčním mutagenem) po 3 miskách

kontrolní misky (bez rozpouštědla) po 2 miskách

- Spočítat potřebné množství misek, vrchního agaru a roztoku HisBio (vrchní agar: 2ml/miska, HisBio: 10ml/100ml vrchního agaru,)



- spočítat potřebné množství směsi S9 a navážit suché substance (NADP a G-6-P).
- Naočkovat vybrané kmeny *S.typhimurium* do tekutého média Nutrient Broth Oxoid No.II s přidavkem příslušných antibiotik. Kultivovat v Erlenmeyerových baňkách pokrytých alobalem, event. plastových kultivačních nádobkách, v třepací vodní lázni při  $37\pm 1^\circ\text{C}$  a cca 100 kmitech za min. Délka kultivace je 16 hod, u YG kmenů může být delší (až 24 hod).
- Připravit roztoky referenčních mutagenů.
- Sterilizovat plastové nástavce do dávkovačů parami persterilu, přes noc nechat odvětrat pod UV lampou.
- Uklidit box s jeho následným vysvícením UV lampou - přes noc.

### ***Den experimentu***

- Vizuálně zkontrolovat nárůst bakteriální kultury (zákal kultivačního média) a malé množství (50 $\mu\text{l}$ ) odebrat a umístit do chladničky pro stanovení titru.
- Titr narostlé bakteriální kultury slouží k ověření nárůstu indikátorových buněk po celonoční kultivaci. Vzorek kultury se postupně ředí 0,015 M fosfátovým pufrům o pH 7,4, vždy 2 ml pufru a 20  $\mu\text{l}$  bakteriální kultury (každé ředění pečlivě protřepat a použít novou špičku), ředění 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-8</sup> v objemu 100  $\mu\text{l}$  dát do 2 ml vrchního agaru s HisBio a vylít na misku s živným agarem. Kultivovat 24 h v termostatu při  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Optimální hustota výchozí bakteriální kultury je 1-2 x 10<sup>9</sup>/ml.
- Připravit 5x koncentrovanou suspenzi kmene. Narostlou kulturu centrifugovat 10 min při 10000 otáčkách/min a chlazení. Supernatant slít a sediment resuspendovat ve vychlazeném 0,015 M fosfátovém pufru tak, aby se dosáhlo 5x menšího objemu oproti výchozímu množství kultury.
- Vytemperovat předem připravené vzorky umístěné ve stojanu na teplotu laboratoře.
- Připravit směs S9: K naváženým substancím (NADP a G-6-P) přidávat postupně tekuté složky, nejdříve vodu. Po jejich rozpuštění směs přefiltrovat přes sterilní milliporový filtr (Millex HV 0,45 $\mu\text{m}$ ) a po filtraci sterilně přidat jaterní homogenát. Směs musí být stále umístěna v lázni s ledovou tříští.
- Okraje zkumavek s vytemperovanými vzorky lehce ožehnout nad plamenem a ke každé zkumavce přidat 50 $\mu\text{l}$  5x konc. bakteriální kultury a 50 $\mu\text{l}$  směsi S9 (+S9) nebo 0,015M fosfátovém pufru (-S9). Po nadávkování označený stojan protřepat, překrýt parafilmem, zaznamenat čas a na 90 minut umístit do termostatu při  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Stejným způsobem se postupuje i u kontrolních misek - místo vzorků se preinkubace provádí s 5 $\mu\text{l}$  rozpouštědla (negativní kontrola), s 5 $\mu\text{l}$  referenčního mutagenu (pozitivní kontrola) a s pouhou bakteriální kulturou se směsí S9 nebo pufrům.
- Po 90 minutách se inkubace vzorků přerušuje vložením stojanů do vody s ledem.
- Vodní lázeň se vytemperuje na  $45\pm 1^\circ\text{C}$

- K preinkubovaným vzorkům se přidá 2 ml rozehřátého vrchního agaru s HisBio a vylije na popsané misky.
- Po zatuhnutí agaru se misky obrátí víčky dolů a inkubují 72 hod v termostatu při 37±1°C.
- Zkontroluje se sterilita vrchního agaru, směsi S9 a pufu.

**Další postup včetně odečítání výsledků kultivace, zpracování a archivace dat - je shodný se standardním miskovým testem podle Amese. Shodné jsou také možné rušivé vlivy a kontrola kvality.**

## **Literatura**

**Maron D.M., Ames B.N. :** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113, 173 - 215, 1983

**Bernstein L., Kaldor J., McCann J., Pike M.C.:** An Empirical Approach to the Statistical Analysis of Mutagenesis Data from the Salmonella Test. Mutat. Res. 97, 267 - 281, 1982

**Kado N.Y., Langley, D., Eisenstadt, E.:** A simple modification of the Salmonella liquid- incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in humane urine, Mutat Res, 121, 25-32, 1983

**Stead, A.G., Hasselblad, V., Creason, J.P., Claxton, L.D.:** Modeling the Ames Test. Mutat. Res. 85, 13 - 27, 1981

**Černá, M., Pastorková, A., Vrbíková, V., Šmíd, J., Rössner, P.:** Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM10) in the Czech Republic. Mutat. Res., 444, 1999, 373-386

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 372; 267 082 378; 267 082 354; fax: 267 082 378;  
e-mail: [jiri.smid@seznam.cz](mailto:jiri.smid@seznam.cz); [mcerna@szu.cz](mailto:mcerna@szu.cz); [apastor@szu.cz](mailto:apastor@szu.cz)

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### **8. Zpracování vzorků moče pro stanovení mutagenity pomocí Amesova miskového testu (plate incorporation assay) nebo pomocí mikrosuspenního testu dle Kado**

**Původ metody:** R.W.Williams a kol., Comparative yields of mutagens from cigarette smokers urine obtained by using solid-phase extraction techniques, Environ. Mol. Mutagen. 14 (1989) 20 - 26

Norma: Firemní metodika J.T.Baker (Bakerbond SPE - Application Notes)

Zpracoval: Ing. Jiří Šmíd; Prof. MUDr. Milena Černá, DrSc.;  
MUDr. Anna Pastorková, CSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Postup umožňuje připravit a extrahovat vzorek moče pro stanovení mutagenní aktivity pomocí bakteriálních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium*.

## **2. Definice**

Při expozici člověka genotoxickým látkám v pracovním či komunálním prostředí mohou být tyto látky nebo jejich metabolity s genotoxickým účinkem vylučovány močí. Přítomnost mutagenní aktivity v moči (signifikantně vyšší než u neexponovaných osob) signalizuje aktuální expozici osoby nebo skupiny osob látkám s mutagenním účinkem.

## **3. Princip metody**

Pro extrakci se používá metoda SPE (extrakce na pevné fázi) po inkubaci moče s  $\beta$ -glukuronidázou-arylsulfatázou. Množství moče je zvoleno tak, aby absolutní množství kreatininu ve vzorcích bylo konstantní. Organické látky obsažené v moči jsou zachyceny na kolonce s náplní C18 a extrakcí metanolem převedeny do roztoku. Po odpaření metanolu je organický extrakt rozpuštěn v DMSO.

### **Definice pojmů**

SPE - extrakce na pevné fázi

C18 - SPE kolonky reverzní fáze C18 (oktadecyl) firmy Baker - hmotnost náplně 1g

## **4. Bezpečnost práce**

Je nutno dodržovat ČSN 018003 (Zásady pro práci v chemických laboratořích). Metodika vyžaduje práci s organickými rozpouštědly, s látkami mutagenního a karcinogenního účinku a s biologickým materiálem (moč).

Je třeba:

- Dodržovat zásady běžné pro práci v chemické laboratoři,
- používat pomůcky osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky,
- dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí - při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami (mutageny, karcinogeny), včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie, materiály, činidla**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

## **Chemikálie**

Metanol p.a.  
Dimetylsulfoxid - DMSO (p.a.)  
sterilní destilovaná voda  
 $\beta$ -glukuronidáza/arylsulfatáza (Sigma)  
fosfátový pufr o pH 6,8  
tlaková láhev s dusíkem (čistota 4.0)

## **Chemikálie ke stanovení kreatininu:**

### ***Materiály***

SPE kolony reverzní fáze C<sub>18</sub> (oktadecyl) firmy Baker - hmotnost náplně 1g  
laboratorní sklo - kalibrované zkumavky, pipety atd.

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

ultrazvuková lázeň  
zdroj vakua (např. vodní vývěva)  
vakuové extrakční zařízení fy J. T. Baker (spe - 12G)  
stojan na odpařování v dusíkové atmosféře  
mraznička (- 18 - 20°C)  
magnetická míchačka

## **7. Pracovní postup**

### **Odběr vzorku**

Vzorek moče se odebírá do uzavíratelných polyetylenových kontejnerů. Způsob odběru se řídí charakterem studie:  
profesionální expozice - odběr na konci pracovní směny ve druhé polovině pracovního cyklu,  
24hodinová moč - sběr moče během celého dne,  
ranní moč - první vzorek moče po probuzení.  
Pokud není možno vzorky zpracovat okamžitě, skladují se v mrazničce při -18°C.

### **Stanovení kreatininu**

Podle standardního operačního postupu

### **Výpočet objemu moče**

Na základě hodnot kreatininu zjištěných u jednotlivých vzorků moče se objem moče použitý pro extrakci standardizuje tak, aby absolutní množství kreatininu u každého vzorku bylo konstantní. Při stanovení mutagenity se pak vzorek moče aplikuje vždy jednotně, a to minimálně 4 dávky udané v mg kreatininu/misku.

### **Příklad:**

Pro otestování vzorku na 3 kmenech klasickým miskovým testem je potřeba cca 90 mg kreatininu. Objem moče, který toto množství kreatininu obsahuje, se vypočte podle vzorce:

$$V = (1000 \times 90)/\text{kreat [mg/l]}$$

### **Postup:**

Odměřené množství moče se doplní na minimální objem 100 ml 0,9% roztokem NaCl a pH upraví na 4,5 - 5,0. V případě nedostatečného množství moče se zpracuje i menší objem moče a dávky kreatininu se přizpůsobí.

### ***Inkubace moče s $\beta$ -glukuronidázou***

Vzorek moče se inkubuje s  $\beta$ -glukuronidázou-arylsulfatázou o aktivitě 50 j/ml moče po dobu 3 hodin při 37°C.  $\beta$ -glukuronidáza se ředí na požadovanou koncentraci fosfátovým pufrům o pH 6,8 (Sörrensen).

### **Příprava pracovního roztoku:**

0,275 ml  $\beta$ -glu (orig. Sigma 91 000j/ml) + 0,725 ml pufru nebo: 0,184 ml  $\beta$ -glu (orig. Sigma 136 000j/ml) + 0,816 ml pufru  
Aplikace: 2 $\mu$ l pracovního roztoku/1 ml moče

### **Příprava separační kolonky a extrakce:**

SPE kolonky se umístí do odsávacího systému BAKER a přes pojistnou láhev se připojí vakuum. Na každou kolonku je nasazen 150 ml rezervoár. Kolonka se promyje nejdříve 20 ml metanolu p.a. a pak 20 ml sterilní destilované vody (kolona nesmí vyschnout!). Vypočtené množství naředěného a inkubovaného vzorku moče se přefiltruje přes filtrační papír a prosaje takto připravenou SPE kolonkou. Každá kolonka se pak promyje 20 ml destilované vody a suší asi 10 minut prosáváním vzduchu.

### **Desorpce**

Vnitřek odsávacího SPE systému se vytře dosucha, kolonky se zevnitř vysuší vatou. Pod SPE kolonky se nasadí kalibrované zkumavky a sorbované látky se vymyjí 10 ml metanolu.

### **Příprava vzorku pro standardní Amesův miskový test**

Pro standardní miskový test je třeba takto připravený extrakt převést do DMSO - v koncentraci 30 mg kreatininu/ml DMSO. Výměna rozpouštědel se provádí

v dusíkové atmosféře při 37°C. Metanol se odpaří téměř dosucha, přidá potřebný objem DMSO a vzorek se homogenuje v ultrazvukové lázni.

**Výpočet objemu DMSO:** 
$$\frac{\text{celkové množství kreatininu ve vzorku}}{\text{požadovaná koncentrace kreatininu}}$$

Hotový extrakt lze uchovávat v mrazničce až do zpracování.

### **Příprava vzorku pro mikrosuspensní test dle Kado**

Pro přípravu jednotlivých dávek se použije přímo metanolový extrakt.

### **Výpočty**

Jsou uvedeny v textu.

### **8. Rušivé vlivy**

Nedostatečně čistá rozpouštědla, kontaminace vzorku, lidský faktor.

### **9. Kontrola kvality**

Ke každému pokusu je přidán slepý vzorek (místo moče se použije sterilní destilovaná voda, inkubuje se, extrahuje na SPE a desorbuje metanolem).

Kontrola SPE kolonky při otevření nové šarže se provádí extrakcí metanolem.

### **Literatura**

**Williams, R.W., Pasley, T., Watts, R., Inmon, J., Fitzgerald, J., Claxton, L.:** Comparative yields of mutagens from cigarette smokers urine obtained by using solid-phase extraction techniques, Environ. Mol. Mutagen. 14, 1989, 20 - 26.

**Černá, M., Pastorková, A., Myers, S.R., Rössner, P., Binková, B.:** The use of a urine mutagenicity assay in the monitoring of environmental exposure to genotoxins. Mutat. Res., 391, 1997, 99-110.

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 372; 267 082 378; fax: 267 082 378;  
e-mail: [jiri.smid@seznam.cz](mailto:jiri.smid@seznam.cz); [mcerna@szu.cz](mailto:mcerna@szu.cz)

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### **9. Příprava vzorku pitné vody pro testování jeho mutagenity pomocí Amesova miskového testu (plate incorporation assay) nebo pomocí mikrosuspenzního testu dle Kado**

**Původ metody:** Monarca, S., Hongslo, J.K., Kringstand, A., Carlberg, G.E.:  
Microscale fluctuation assay coupled with Sep-Pak  
concentration as a rapid and sensitive method for screening  
mutagens in drinking water.  
Water Res., 10, 1985, 1209-1216.

**Norma:** Firemní metodika J.T.Baker (Bakerbond SPE - Application Notes)

**Zpracoval:** Ing. Jiří Šmíd; Prof. MUDr. Milena Černá, DrSc.



## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Postup umožňuje připravit vzorek pitné vody pro stanovení mutagenní aktivity pomocí bakteriálních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium*.

## **2. Definice:**

Voda je příkladem komplexní směsi prostředí obsahující stovky nejrůznějších chemických látek, které se mohou podílet na mutagenní potenci směsi. Pro detekci mutagenity vzorku vody pomocí indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium* je nezbytné připravit organický extrakt těchto látek. Podle předpokládaného charakteru kontaminujících látek ve vodě lze obecně volit různé extrakční postupy. Jeden z nich, používaný v NRL genetické toxikologie SZÚ, je zde uveden.

### **Definice pojmů**

SPE - extrakce na pevné fázi

C18 - SPE kolonky reverzní fáze C18 (oktadecyl) firmy Baker - hmotnost náplně 1g

## **3. Princip metody**

Pro extrakci se používá metoda SPE (extrakce na pevné fázi). Organické látky obsažené ve vodě se zachytí na kolonci s náplní C18 a extrakcí acetonem jsou převedeny do roztoku. Po odpaření acetonu je zbytek rozpuštěn v DMSO.

## **4. Bezpečnost práce**

Je nutno dodržovat ČSN 018003 (Zásady pro práci v chemických laboratořích) Metodika vyžaduje práci s organickými rozpouštědly a s látkami mutagenního a karcinogenního účinku.

Je třeba:

- Dodržovat zásady běžné pro práci v chemické laboratoři,
- používat pomůcky osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky,
- dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí - při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami (mutageny, karcinogeny), včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie, materiály, činidla**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

### **Chemikálie**

Aceton p.a. - predestilovaný

Dimetylsulfoxid - DMSO (p.a.)

destilovaná voda  
tlaková láhev s dusíkem (čistota 4.0)  
kyselina chlorovodíková 36%  
aqua pro injectione

### **Materiály**

SPE kolonky reverzní fáze C18 (oktadecyl) firmy Baker - hmotnost náplně 1g  
Laboratorní sklo - kalibrované zkumavky, pipety atd.

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

ultrazvuková lázeň  
zdroj vakua (např. vodní vývěva)  
vakuové extrakční zařízení fy J. T. Baker (spe - 12G)  
stojan na odpařování v dusíkové atmosféře  
mraznička (- 18 - 20°C)

## **7. Pracovní postup**

### **Příprava separační kolonky a extrakce**

Požadovaný počet SPE kolonek s nástavcem se upevní na extrakční zařízení. Kolonky se promyjí 5 ml acetonu bez použití vakua. 1 l odebraného vzorku pitné vody se okyselí 1 ml koncentrované HCl a vytemperuje na laboratorní teplotu. Po zapnutí vakua se vzorek vody prosaje kolonkou. Obsah kolonky se pak vysuší prosáváním dusíku přes kolonky pomocí vakua po dobu cca 0,5 hod. Jako slepý pokus se použije 1 l injekční vody (aqua pro injectione), zpracovaný stejným postupem.

### **Desorpce**

Po vysušení se vypne vakuum a podtlaková nádoba a SPE kolonky se vytřou vatou do sucha. Do nádoby se vloží stojánek s kalibrovanými označenými 10 ml zkumavkami. Do každé kolonky se přidá 5 ml acetonu a nechá gravitačně protéct. Pokud je odpor sorbentu příliš velký, je opatrně zapojeno vakuum. Ve chvíli, kdy aceton začne protékat, vakuum je nutno vypnout. Takto získaný vzorek lze skladovat po omezenou dobu při teplotě min. -18°C před vlastním provedením testu.

### **Příprava vzorku pro standardní Amesův test**

Acetonový extrakt se odpaří pod proudem dusíku ve vodní lázni při 37°C dosucha. Pipetou se přidá DMSO v objemu 1 ml na 1 l extrahované vody a obsah se promíchá v ultrazvukové lázni (pozn.: pro získání většího objemu extraktu nutného pro testování na více kmenech je možno paralelně použít více kolonek, přes každou projde 1 l vody). Extrakt v DMSO lze uchovávat při teplotě min. -18°C po dobu několika týdnů.

### **Příprava vzorku pro mikrosuspensní test dle Kado**

Extrakt v acetonu se vyndá z mrazničky a nechá vytemperovat na laboratorní teplotu. Dále se postupuje podle Standardního operačního postupu pro mikrosuspensní test dle Kado.

Pozn.: Pro stanovení bakteriální mutagenity organického extraktu pitné vody se nejčastěji používají kmeny TA100, TA98 a YG1041.

### **Výpočty**

Pro vlastní extrakci se žádné výpočty nepoužívají. Při dávkování extraktu pro stanovení mutagenity se vychází z celkového objemu vzorku použitého pro extrakci tak, aby byly standardně testovány alespoň 4 koncentrace vzorku v patřičném dávkovém rozmezí.

### **8. Rušivé vlivy:**

Nedostatečně čistá rozpouštědla (s příměsemi potenciálně mutagenních látek) mohou mít za následek falešnou pozitivitu testu.

Nízká koncentrace potenciálních mutagenů ve sledovaném vzorku může mít za následek falešnou negativitu.

### **9. Kontrola kvality:**

Předestilovaný aceton je nutno průběžně kontrolovat zařazením do pokusu (1 x měsíčně).

Kontrola SPE kolonky se provádí extrakcí acetonem při otevření nové šarže.

Jako slepý vzorek se používá injekční voda.

### **Literatura**

**APHA:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 1995, pp. 8/27 - 8/32

**Meier, J. R.:** Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat. Res.*, 196, 1988, pp. 211-245

**Monarca, S., Zanardini, A., Feretti, D., Dalmiglio, A., Falistocco, E., Manica, P., Nardi, G.:** Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. *Wat. Res.*, 32, 9, 1998, pp. 2689-2695

**Vartiainen, T., Liimatainen, A., Jääskeläinen, S., Kauranen, P.:** Comparison of solvent extractions and resin adsorption for isolation of mutagenic compounds from chlorinated drinking water with high humus content. *Wat. Res.*, 21, 7, 1987, pp. 773-779

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 372; 267 082 378; fax: 267 082 378;  
e-mail: [jiri.smid@seznam.cz](mailto:jiri.smid@seznam.cz); [mcerna@szu.cz](mailto:mcerna@szu.cz)

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### **10. Příprava vzorku ovzduší (prachové částice PM10, PM2,5) pro testování jeho mutagenity pomocí Amesova miskového testu (plate incorporation assay) nebo pomocí mikrosuspenzního testu dle Kado**

**Původ metody:** Federal register, Volume 52, No.52, July 1, 1987, 40 CFR PARTS 50, 51, 52, 53 and 54. Reference Method for the Determination of Particulate Matter as PM 10 in the Atmosphere.

Watts, R. R., Hoffman, A. J., Wilkins, M. C., House, D. E., Burton, R. M., Brooks, L. R., Warren, S. H.: Evaluation of high volume particle sampling and sample handling protocols for ambient urban air mutagenicity determination. J. Air Waste Manage Assoc. 42, 1992, 49-55.

Zpracoval: Ing. Jiří Šmíd; Prof. MUDr. Milena Černá, DrSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Postup umožňuje odběr pevných částic ovzduší libovolného komunálního a pracovního prostředí a přípravu organického extraktu pro stanovení mutagenní aktivity pomocí bakteriálních indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium*.

## **2. Definice pojmů**

Primární standard kvality ovzduší podle velikosti prašného aerosolu je stanoven pro částice, jejichž aerodynamický průměr je menší nebo roven 10  $\mu\text{m}$  (frakce PM 10). Tato frakce se používá i pro stanovení mutagenní aktivity.

Koncentrace aerosolu se udává v  $\text{mg}/\text{m}^3$ , koncentrace EOM (extrahovatelné organické látky) v  $\text{mg}/\text{m}^3$  nebo v  $\text{mg}/\text{ml}$  extraktu.

## **3. Princip metody**

K odběru prachového aerosolu se používá velkoobjemové odběrové zařízení HVPM 10. Při konstantním a známém průtoku vzduchu zařízením se v cyklonech oddělují částice větší než 10  $\mu\text{m}$  a zachycují se na vrstvě silikonového oleje. Částice menší než 10  $\mu\text{m}$  se zachycují na teflonový filtr. Po odběru se filtr zvaží, extrahuje dichlormetanem a po jeho odpaření je extrakt převeden do vhodného rozpouštědla, zpravidla DMSO.

## **4. Bezpečnost práce**

Při údržbě HVPM 10 je zapotřebí odpojit zdroj elektrického proudu. Při odběru musí být odběrové zařízení pro velké rozměry odběrové hlavice stabilizováno a ukotveno.

Při přípravě organického extraktu je nutno dodržovat ČSN 018003 (Zásady pro práci v chemických laboratořích).

Metodika vyžaduje práci s organickými rozpouštědly a s látkami mutagenního a karcinogenního účinku.

Je třeba:

- Dodržovat zásady běžné pro práci v chemické laboratoři,
- používat pomůcky osobní ochrany - ochranný oděv, rukavice, roušky,
- dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí - při práci s rozpouštědly, s nebezpečnými chemickými látkami (mutageny, karcinogeny), včetně likvidace odpadu.

## **5. Chemikálie, materiály, činidla**

Pro použité chemikálie je požadována kvalita čistoty p.a. nebo reagent grade.

## **Chemikálie**

silikonový olej - Dimetylsiloxanum 350  
dichlormetan (HPLC nebo p.a.) - dále jen DCM  
dimetylsulfoxid - DMSO (p.a.)  
destilovaná voda  
tlaková láhev s dusíkem (čistota 4.0)

## **Materiály**

exsikátor s náplní silikagelu s indikátorem  
pinzeta s plochými teflonovými hroty  
vážící kelímek z PE  
štetčeka k natření záchytné desky silikonovým olejem  
laboratorní sklo borosilikátové nebo teflonové  
kalibrované zkumavky o objemu 10 ml se zábrusovou zátkou z borosilikátového skla  
aluminiová folie  
aluminiové misky  
filtry Pallflex 20 x 20 cm pro odběr prachových částic  
teflonové inertní filtry o velikosti pórů 0.45  $\mu\text{m}$   
stojan na odpařování v dusíkové atmosféře

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

analytické váhy s přesností min  $\pm 0,05$  mg  
odběrové zařízení HVPM 10 s regulátorem průtoku a časovacím zařízením  
kalibrátor průtoku  
vakuová odparka  
ultrazvuková lázeň (výkon min. 100 w)  
mraznička (-18 - 20°C)

## **7. Pracovní postup**

### **Vzorkování**

Při odběru je nutno dodržet následující požadavky:  
Odběrový systém umístit minimálně 20 m od stromů, budov či jiných velkých překážek. Obecnou zásadou je, že odběrové zařízení by mělo být vzdáleno od překážky o minimálně dvojnásobek jeho výšky.  
Vstup vzduchu do odběrového systému musí být ve výšce 2 - 7 m nad zemí.  
Vstup vzduchu nesmí být omezován.  
Odběrový systém nesmí být v blízkosti ventilátorů či zdrojů škodlivin.  
Při paralelních odběrech musí být vzdálenost vstupů minimálně 4 m.

### **Odběr vzorku**

Způsob manipulace s velkoobjemovým odběrovým zařízením HVPM 10 (kalibrace, čištění a doprava) je určen výrobcem a je popsán v Operátorské a referenční příručce dodávané s přístrojem.

Filtr se vyjme z krabice (nesmí být poškozen) a spolu s vážícím kelímkem se suší před vážením 48 hodin v exikátoru s náplní SiO<sub>2</sub>. Filtr se váží opatrně stočený do ruličky ve vážícím kelímku. Hmotnost filtru se zaznamená do protokolu. Pak se filtr vloží na otřenou síťku filtračního rámečku a upne. Rámeček s filtrem se k přístroji přepravuje v ochranném hliníkovém krytu (dodává výrobce). Záchytná deska větších částic (je součástí HVPM10) se omyje etanolem nebo lihobenzínem, natře silikonovým olejem a vloží do cyklonu. Rámeček s filtrem se vloží do HVPM 10 a přístroj se zavře. Přístroj se zapne, průtok vzduchu nastaví na 1,13 m<sup>3</sup>/min a provede se kalibrace přístroje dle popisu výrobce. Časový spínač se nastaví na požadovanou dobu odběru (24 hodin). Po odběru se rámeček s filtrem vyjme a překryje ochranným krytem. Takto zabezpečený filtr se dopravuje na místo zpracování. Pokud není možné filtr okamžitě zpracovat, skladuje se v aluminiovém obalu při -18°C v mrazničce. Chceme - li stanovit pouze prašnost, není zmrazení nutné. Exponovaný filtr se suší v exsikátoru 48 hodin a poté váží ve vážícím kelímku. Hmotnost filtru se opět zaznamená do protokolu.

### **Extrakce**

Veškeré laboratorní sklo a pomůcky je nutno před použitím opláchnout dichlormetanem (DCM). Rozstříhaný filtr (cca 2cm proužky) se vloží do teflonové Erlenmeyerovy baňky a extrahuje 3 x 150 ml DCM. Během extrakce v ultrazvukové lázni musí být filtr zcela ponořen v extrakčním médiu. Jednotlivé frakce se pak spojí, spojený extrakt se přefiltruje přes teflonový filtr s velikostí pórů 0,45µm a kvantitativně převede do baňky s kulatým dnem. Obsah baňky se odpařuje ve vakuu vodní vývěvy při teplotě cca 35°C do objemu cca 5 ml. Koncentrovaný extrakt se kvantitativně přenesse do kalibrované odměrné zkumavky, baňka se několikrát vypláchne 1 - 2 ml DCM, ty se přidají do zkumavky a objem se doplní DCM do 10 ml.

### **Stanovení EOM**

Předem je nutno si připravit váženky z aluminiové folie, které musí být co nejlehčí (o hmotnosti do 0,15 g) a zkontrolovat jejich nepropustnost. Váženky se vypláchnou destilovanou vodou, metanolem, DCM, popíší lihovým fixem, a umístí do exsikátoru. Před použitím se zváží, hmotnost se zaznamená. Z přesného objemu extraktu (10 ml) se do dvou váženek umístí po 0,5 ml extraktu a nechá odpařit do sucha při pokojové teplotě. Zbylý extrakt (9 ml) se umístí do mrazničky. Váženky s odpařeným extraktem se vloží na 24 hodin do exsikátoru. Poté se váženky s odpařeným extraktem (bezprostředně po vyjmutí z exsikátoru) zváží na analytických vahách. Stanoví se průměrná hodnota EOM

v mg/ml extraktu, celkové množství EOM v mg, EOM v mg/m<sup>3</sup> a % extrahovatelnosti.

### **Příprava vzorku pro standardní Amesův miskový test**

Kalibrovaná zkumavka s 9 ml extraktu v DCM se vyjme z mrazničky a nechá vytemperovat na teplotu místnosti. Extrakt se odpaří pod proudem dusíku ve vodní lázni při cca 35°C téměř do sucha. Extrahované látky se převedou do DMSO tak, že se přidá množství DMSO v takovém objemu, aby konečná koncentrace EOM/ml DMSO byla 1 - 4 mg/ml.

### **Příprava vzorku pro Kado test**

Kalibrovaná zkumavka s 9 ml extraktu v DCM se vyjme z mrazničky a nechá vytemperovat na teplotu místnosti. Dále se postupuje podle Standardního operačního postupu pro mikrosuspenzní test dle Kado.

### **Výpočty**

EOM celkem [mg] =  $\emptyset$  EOM [mg/ml] x 10 [ml]

EOM [mg/m<sup>3</sup>] = EOM celkem [mg] / Prosáté množství vzduchu [m<sup>3</sup>]

Extrahovatelnost [%] = 100 x EOM celkem [mg] / Navážka na filtru [mg]

## **8. Rušivé vlivy:**

Po vlastním odběru je nutno zkontrolovat, zda během odběru nedošlo k výpadku elektrického proudu, pokud ano, je zapotřebí čas výpadku odečíst.

Při přípravě váženek z aluminiové folie může dojít porušení nepropustnosti váženky, tu pak je nutno vyhodit a použít jinou. Kontrola se provede označením dna (zevně) fixem a přidáním 0,5 ml DCM.

Nedostatečně čistá rozpouštědla: pokud obsahují příměsi potenciálně mutagenních látek, mohou mít za následek falešnou pozitivitu testu, pokud obsahují inertní látky, mohou zkreslovat hodnotu EOM a tedy i další výpočty vedoucí ke stanovení mutagenity.

## **9. Kontrola kvality:**

Průběžné provedení slepého pokusu - stanovení mutagenní aktivity extraktu prázdného filtru a samotného DCM.

### ***Pozn.:***

Úplné požadavky na zajišťování validních údajů, jejich správnosti a přesnosti jsou uvedeny v „*Quality Assurance Handbook of Air Monitoring systems, Volume II, Section 11.3 and 11.7*“.



## **Literatura:**

Aerosol Sampling Characteristics of the Sierra - Andersen Model 1200 PM - 10 Inlet. Andrew R. McFarland and Carlos A. Ortiz, Texas A & M University Aerosol Technology Laboratory Report 4716/01/08/87/ARM, August 1987

Federal register, Volume 52, No.52, July 1, 1987, 40 CFR PARTS 50, 51, 52, 53 and 54. Reference Method for the Determination of Particulate Matter as PM 10 in the Atmosphere

**Watts, R.R., Hoffman, A.J., Wilkins, M.C., House, D.E., Burton, R.M., Brooks, L.R., Warren, S.H.:** Evaluation of high volume particle sampling and sample handling protocols for ambient urban air mutagenicity determination. J. Air Waste Manage Assoc. 42, 1992, 49-55

**Černá, M., Pastorková, A., Vrbíková, V., Šmíd, J., Rössner, P.:** Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM10) in the Czech Republic. Mutat. Res., 444, 1999, 373-386

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě  
oddělení genetické toxikologie  
e-mail: [jaromira.kusova@khssova.cz](mailto:jaromira.kusova@khssova.cz)

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### 11. SOS chromotest

**Původ metody:** P. Quillardet, M. Hofnung: The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, Mutation Research, 147 (1985), 65 - 78

*Upozornění:*

*Test zahrnuje použití geneticky modifikovaných organismů. Jejich použití podléhá účinnosti Zákona 153/2000 Sb.*

Zpracoval: RNDr. Jaromíra Kůsová

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Jde o alternativní test, který je schopen pomocí bakteriálních kmenů indikovat, zda zkoumaná chemická látka nebo skupina (směs) různých látek projevuje v tomto systému genotoxické vlastnosti na základě indukce reparace DNA.

## **2. Definice**

Test je založen na zjištění pozitivitu (genotoxicity) nebo negativitu (látka není v systému genotoxická) v testovaném vzorku, a to prostřednictvím indukce SOS reparačního genu *sfiA* ve srovnání s konstitutivním PHOc markerem.

## **3. Molekulárně genetická podstata testu (princip metody)**

Indikátorovým kmenem daného systému je *Escherichia coli* PQ 37. Tento bakteriální kmen nese operonovou fúzi *sfiA::lacZ* a delecii v normální oblasti *lac* (= strukturní gen pro enzym  $\beta$ -galaktozidázu). Tímto se produkce enzymu  $\beta$ -galaktozidázy dostává striktně pod kontrolu *sfiA* exprese (*sfiA* patří mezi tzv. SOS geny). Látky genotoxické mění nebo poškozují genetický materiál buňky. Takovýto zásah má u živých organismů za následek indukci SOS-reparačního systému, jehož úkolem je opravit poškozenou DNA. V indikátorovém systému SOS chromotestu vede exprese genů SOS-reparačního systému, a pouze ona, k syntéze de novo enzymu  $\beta$ -galaktozidázy, jejíž enzymatická aktivita může být změřena. Pro kontrolu celkové proteinové syntézy během inkubace je paralelně sledována enzymatická aktivita alkalické fosfatázy (vyjádření konstitutivního markeru PHOc). Poměr aktivit  $\beta$ -galaktozidázy a alkalické fosfatázy je považován za míru specifické aktivity  $\beta$ -galaktozidázy, a tudíž za kvantitativní parametr charakterizující genotoxicitu látky (její schopnost indukovat SOS reparační systém buňky).

## **4. Bezpečnost práce**

Metodika zahrnuje práci s biologickými činiteli (bakteriální indikační kmen), chemickými rozpouštědly,  $\beta$ -merkaptetanolem, kyselinou chlorovodíkovou a látkami klasifikovanými jako mutageny, karcinogeny a látky poškozující reprodukci (standarty pro testovací systém).

Proto je třeba dodržovat běžné zásady pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři, dbát na zabránění úniku bakteriálního kmene z laboratoře. Při používání chemických karcinogenů a mutagenů a chemických látek označených jako nebezpečné pro zdraví i životní prostředí dbát na zamezení kontaminace prostředí (použití polopropustné podložky) i pracovníků (použití ochranných oděvů a pomůcek). Zacházet s odpady dle platných nařízení.

## **Materiálně technické vybavení laboratoře**

Pro provedení SOS chromotestu lze použít standardně vybavenou bakteriologickou laboratoř.

### **5. Přístroje**

spektrofotometr (měření v oblasti viditelného světla) s kyvetami  
rotační třepačka s možností termostatování, třepací vodní lázeň  
automatické pipety  
analytické váhy  
chladnička  
mraznička

### **Pomocná zařízení**

pH-metr  
termostat  
plynový kahan  
laboratorní sklo  
kryozkumavky  
germicidní zářiče

### **5. Chemikálie a roztoky**

*Poznámka: Používané chemikálie čistoty p.a. nebo vyšší.*

### **Média pro kultivaci bakteriálních kmenů**

*Poznámka: Tato média musí být sterilní.*

#### ***L-médium***

Rozpusťte 5 g Bacto yeast extrakt, 10 g Bacto tryptone a 10 g NaCl v 1000 ± 2 ml destilované vody. Krátce autoklávovat. Konečné médium musí být pouze nažloutlé, nikoli nahnědlé.

#### ***La-médium***

Připravuje se před použitím přidáním 20 µg ampicilinu do 1 ml L-média.

#### ***L-plotny***

Rozpusťte 15 g Bacto agaru, 5 g Bacto yeast extraktu, 10 g Bacto tryptone a 5 g NaCl v 1000 ± 2 ml destilované vody. Autoklávovat (20 min. při 121°C), vylít na Petriho misky, nechat utuhnout.

#### ***La-plotny***

Mají stejné složení jako L-plotny. Po vyautoklávování a částečném zchladnutí se do 1000 ± 2 ml média přidá 20 mg ampicilinu (2 ml roztoku ampicilinu 10mg/1ml) před vylitím na misky.

### ***Top-agar***

Rozpustit 8 g Bacto agaru a 5 g NaCl v 1000 ± 2 ml destilované vody. Autoklávovat (20 min. při 121°C), rozplnit po objemech cca 200 ml, nechat ztuhnout při pokojové teplotě. Skladovat v chladnu a temnu, před použitím rozvařit (teplem rozpustit v celém objemu).

### **Média pro SOS spot test**

*Poznámka: Tato média musí být sterilní.*

#### **M6 médium**

18,0 g Difco minimal agar, 13,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2,0 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O rozpustit v 900 ± 2 ml destilované vody a upravit pH na hodnotu 7,0 ± 0,2 pomocí KOH. Vyautoklávovat (20 min. při 121 °C). 0,5g FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O rozpustit ve 100 ± 1 ml sterilní destilované vody a vysterilizovat v Arnoldově přístroji (jinak se srazí). Poté spojit s 900 ml výše uvedeného agaru na 1000 ml M6 média.

#### ***STA-plotny (pro test –S9)***

Připravit médium obsahující následující vodné roztoky: 2,0 ml 20% laktózy, 2,0 ml 1% tryptofanu, 2,0 ml 1% threoninu, 2,0 ml 1% histidinu, 2,0 ml 1% uracilu, 2,0 ml 1% thiaminu, 0,5 ml 20% glukózy a 2,0 ml roztoku ampicilinu (10mg/1ml). Dále přidat 2,0 ml roztoku X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosidu) (20mg/1ml DMSO) a vše smíchat s 1 litrem vyautoklávovaného zchlazeného M6 média a vylévat na plotny.

Všechny roztoky připravovat ve sterilních podmínkách (kromě roztoků cukrů nelze autoklávovat). Uchovávat v lednici lze pouze roztoky cukrů a roztok histidinu (po dobu 1 měsíce). Ostatní roztoky připravovat vždy čerstvé.

#### ***STB-plotny (pro test +S9)***

Plotny připravit stejně jako STA-plotny, pouze se nepřidává 0,5 ml 20% glukózy.

### **Roztoky pro standardní SOS chromotest**

*Poznámka: Není požadavek na sterilitu, nýbrž na chemickou čistotu.*

### **Pufry**

#### ***T-pufr***

Rozpustit 24,2 g tris(hydroxymetyl)aminometanu (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) asi ve 100 ml sterilní destilované vody, upravit pH pomocí HCl na hodnotu 8,8 ± 0,2. Přidat 0,2 g dodecylsulfátu sodného (SDS) a objem doplnit sterilní destilovanou vodou na konečných 200 ml. Skladovat v temnu při pokojové teplotě.

### ***P-pufř***

Rozpustit ve sterilní destilované vodě 5,08 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (nebo 10,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ), 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,19 g KCl, 0,06 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Nastavit pH pufru na  $7,0 \pm 0,2$ . Dále přidat 0,25 g SDS a 0,7 ml  $\beta$ -merkaptoetanolu. Doplnit destilovanou vodou na 250 ml. Skladovat v temnu při pokojové teplotě.

0,1M fosfátový pufr (pH  $7,0 \pm 0,2$ )

### **Roztoky substrátů enzymatických reakcí**

*Poznámka: Oba roztoky uchovávat v chladnu, chránit před světlem, připravit v den použití. Pozor na čistotu chemického skla.*

#### ***Roztok p-nitrofenylfosfátu (PNPP)***

Rozpustit 4,0 mg PNPP na 1 ml T-pufru /nebo 6,8 mg dvojsodné soli 4-nitrofenylfosfátu (hexahydrát) na 1 ml T-pufru/.

#### ***Roztok o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranozidu (ONPG)***

Rozpustit 4,0 mg ONPG na 1 ml 0,1M fosfátového pufru.

### **Roztoky pro zastavení enzymatických reakcí**

2M roztok HCl

2M roztok trisu / tris(hydroxymetyl)aminometan ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )/

1M roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

### **Roztoky pro S9 mix**

*Poznámka: Roztoky musí být sterilní. Doporučuje se filtrace hotového S9 mixu přes bakteriální filtr (0,22 $\mu\text{m}$ ).*

**0,4M roztok trisu** /tris(hydroxymetyl)aminometan ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )/

Roztok solí: 1,65M KCl + 0,4M  $\text{Mg}^{2+}\text{Cl}_2$ . Možno autoklávovat.

**0,1M roztok NADP** v 0,4M roztoku trisu. Uchovávat pouze několik hodin v ledové tříšti. Možnost použití zmraženého roztoku.

**1M roztok glukózo-6-fosfátu** v 0,4M roztoku trisu. Rovněž připravovat před použitím a uchovávat v ledové tříšti. Možnost použití zmraženého roztoku, avšak rozmražený již znovu nemrazit.

### **S9 frakce**

je postmitochondriální frakce jaterního homogenátu laboratorního potkana, která je komerčně dostupná nebo připravovaná dle popisu publikovaném v Maron, Ames, Mutation Research, 113 (1983), 173 - 215.

### **Příprava S9 mixu**

Smíchat následující roztoky: 0,20 ml solí KCl + Mg<sup>2+</sup>, (1,65M KCl + 0,4M Mg<sup>2+</sup>), 0,05 ml 1M glukózo-6-fosfátu, 0,15 ml 0,1M NADP, 2,50 ml 0,4M trisu, 6,10 ml L-média a 1,00 ml S9 frakce. Připravit těsně před použitím, uchovávat v ledové tříšti. Nelze zmrazit a použít po rozmražení.

*Poznámka: optimum podílu NADP, glukózo-6-fosfátu a S9 v S9mix může být standardizováno pro určitou zkoušenou látku (popis není součástí tohoto postupu), proto mohou být jmenované složky odlišné.*

### **Referenční látky**

Jako standardů (pozitivních kontrol) se používá roztoků 4-nitrochinolin-1-oxidu (4-NQO) nebo mitomycinu C pro test bez metabolické aktivace (-S9) a aflatoxinu B<sub>1</sub>, 2-aminofluorenu (2-AF) nebo benzo/a/pyrenu (B/a/P) pro test s metabolickou aktivací (+S9). Možno použít i další.

### **Testované vzorky**

Testované látky, ať čisté či extrahované z potravin, půdy, ovzduší, biologického materiálu, či voda pitná i odpadní, jsou s ohledem na svůj charakter rozpouštěny pro aplikaci do testu ve sterilní destilované vodě, dimetylsulfoxidu (DMSO), etanolu, tetrahydrofuranu (THF), případně jiném známém rozpustidle, které je pro bakteriální systém akceptovatelné a zároveň nevykazuje genotoxickou aktivitu. Vzhledem ke skutečnosti, že je vždy testována koncentrační škála látky, je nutno volit ředění tak, aby maximální dávka roztoku testované látky, aplikovaná do testu, nepřesáhla 30 - 50 µl (podle druhu rozpouštědla).

*Poznámka: DMSO může při skladování vytvářet genotoxické produkty.*

### **Interference**

Výsledky a reprodukovatelnost testu mohou být pozměněny při testování intenzivně zbarveného vzorku. V tomto případě je nutné přidat další kontrolu pro korekci zbarvení vzorku nebo provést centrifugaci bakterií po inkubaci bakteriálního systému s testovanou látkou. Teprve po tomto kroku přistoupit k dezintegraci buněk a měření aktivity sledovaných enzymů.

## **6. Pracovní postup**

SOS chromotest je kolorimetrický test, v němž je měřena a hodnocena optická densita produktů enzymatického rozkladu specifických substrátů (enzymatická aktivita) dvou zmíněných enzymů pro několik koncentrací sledované látky. Vzhledem ke skutečnosti, že chemické látky podléhají v těle savců chemickým přeměnám na metabolity, které mohou být v některých případech nebezpečnější nežli původní látky z hlediska jejich genotoxicity, je test prováděn v alternativě

pouze s indikátorovou bakteriální kulturou (test -S9), nebo v alternativě, kdy jsou vedle bakterií přidávány i savčí enzymy, podílející se metabolismu cizorodých látek v těle savců (test +S9).

### **Testovací organismy**

Indikátorovým kmenem daného systému je gramnegativní bakterie *Escherichia coli* PQ 37. Tento bakteriální kmen nese několik molekulárních markerů. Vedle operonové fúze *sfiA::lacZ* a delece v normální oblasti *lac*, jde o *rfa* mutaci, vyvolávající lipopolysacharidovou deficienci v buněčné stěně bakterie, *uvrA* mutaci, eliminující vyjádření genových funkcí excizní reparační, přítomnost  $\text{PHO}^{\circ}$  markeru, který zajišťuje konstitutivní tvorbu alkalické fosfatázy, a genu pro ampicilinovou resistenci. (Další specifikace kmene viz Quillardet, Hofnung, Mutation Research, 297(1993), 235-279.)

### **Uchovávání a příprava suspenze bakteriálního kmene**

Bakteriální kmen je uchováván jako zmrazená kultura (s kryoprotektivní látkou DMSO nebo glycerolem) při  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  po dobu 6 měsíců nebo při  $-70 \pm 2^{\circ}\text{C}$  neomezeně. Rovněž jako nátěr noční kultury na  $L_a$  plotně při  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 měsíce.

Popisovaný test začíná přípravou noční kultury bakteriálního kmene. Do 5 ml  $L_a$ -médiu se přenese 0,05 - 1,0 ml zmrazené kultury a kultivuje se v třepací vodní lázni při  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  přes noc (16 - 19 hodin). Z noční kultury se pro test připraví pracovní suspenze o koncentraci buněk řádově  $10^8$  cfu/ml asi dvouhodinovou kultivací 0,1 ml noční kultury v pěti ml  $L_a$ -médiu. Délka kultivace se pro nově připravené  $L$ -médium vždy prověří titrací bakteriální kultury.

### **Prověřování vlastností kmene**

Před provedením série testů s danou šarží zmrazené bakteriální kultury je nutné kmen *Escherichia coli* PQ 37 prověřit na přítomnost molekulárních markerů.

**Přítomnost *rfa* mutace:** Do 2 ml vlažného tekutého top-agaru (cca  $45^{\circ}\text{C}$ ) se přidá 0,1 ml noční kultury bakteriálního kmene a po protřepání se vylije na  $L$ -plotnu. Při pokojové teplotě se nechá agar zatuhnout. Na povrch misky se aplikuje disk filtračního papíru napuštěný 10  $\mu\text{l}$  roztoku krystalové violeti (1 mg/1 ml). Miska se kultivuje 18 - 24 hodin při teplotě  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  v termostatu. Přítomnost genu pro resistenci k ampicilinu se prověří stejným postupem jako u *rfa* mutace, ale na povrch misky se aplikuje disk nesoucí 80  $\mu\text{g}$  ampicilinu (10  $\mu\text{l}$  roztoku ampicilinu 8 mg/ 1 ml).

**Mutace *uvrA*:** Na  $L$ -plotnu navrstvíme bakteriální kmen v top-agaru připravený stejným způsobem jako u prověřování *rfa* mutace. Po utužení se polovina misky přikryje a nechráněná část bakteriální kultury se ozáří germicidním



zářičem ( $15 \pm 1W$ ) ze vzdálenosti  $33 \pm 2$  cm po dobu 6 - 9 s. Poté misky umístíme do termostatu (do tmy) a kultivujeme při  $37 \pm 1^\circ C$  18 - 24 hodin.

Konstitutivní tvorbu alkalické fosfatázy zjistíme podle schopnosti bakteriálního kmene přeměnit nebarevný substrát tohoto enzymu v barevný produkt. Na proužek filtračního papíru, napuštěný roztokem PNPP (4mg/ml trisu) a umístěný na povrchu L-plotny, nanese se kličkou velmi hustě kultura E.coli (z L<sub>a</sub>-plotny). Za několik minut se začne projevovat žluté zbarvení, které svědčí o přítomnosti fosfatázy.

Inducibilita *sfiA::lacZ* operonové fúze se prověřuje známým mutagenem, který musí jevit očekávaný efekt. Samotná zkouška na inducibilitu uvedené operonové fúze může být provedena spot testem nebo standardním SOS chromotestem.

### **Postup provedení SOS spot testu**

Spot test je plotnová varianta chromotestu, která vychází ze stejně definovaného bakteriálního systému i principu (syntéza enzymu  $\beta$ -galaktozidázy striktně dána expresí SOS genů). V tomto případě se enzymatická aktivita  $\beta$ -galaktozidázy prokazuje rozkladem specifického substrátu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktozidu), obsaženého v živné půdě bakterií. Ten se po enzymatické hydrolýze  $\beta$ -galaktozidázou mění v barevný produkt, tvořící na plotně menší nebo větší barevnou zónu, svědčící o přítomnosti a aktivitě indukované  $\beta$ -ga-laktozidázy. Spot test se hodnotí pouhým okem, nemá korekci na celkovou proteosyntézu, a proto mohou být v některých případech výsledky nejednoznačné, obzvláště v testu s metabolickou aktivací.

Pro test bez metabolické aktivace (- S9) se do 2,4 ml tekutého top agaru přidá 0,1 ml pracovní suspenze nebo noční kultury bakteriálního kmene, po protřepání se vylije na STA plotnu, nechá se částečně utuhnout a do středu plotny je aplikován vzorek sledované látky (maximálně 10 $\mu$ l). Po noční kultivaci se na plotně u látek, vyvolávajících expresi SOS genů, objeví barevný kroužek kolem inhibiční zóny, který dokazuje schopnost sledované látky indukovat *sfiA::lacZ* fúzi.

V testu s metabolickou aktivací (+S9) se ke 2 ml tekutého top agaru přidá 0,4 ml S9 mixu a 0,1 ml pracovní suspenze bakteriálního kmene. Další postup je stejný jako v testu -S9, ale používají se STB plotny.

### **Postup standardního SOS chromotestu**

Pracovní suspenze bakteriální kultury se pro aplikaci do standardního SOS chromotestu 10x ředí (1:9). Pro test bez metabolické aktivace (- S9) se 1 ml pracovní suspenze přidá k 9 ml čerstvého L-média, pro test s metabolickou aktivací (+S9) k 9 ml S9mixu.

Do zkumavek, v nichž je nachystáno několik koncentrací testované látky (škála vždy začíná nulovou koncentrací testované látky, k níž se potom naměřené hodnoty vztahují jako ke kontrole), přidáme po 0,6 ml bakteriální kultury

zředěné L-médiem nebo S9 mixem. Poté zkumavky umístíme na rotační třepačku a při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubujeme 2 hodiny. Po ukončení inkubace je třeba pro každou koncentraci testované látky určit enzymatickou aktivitu  $\beta$ -galaktozidázy a alkalické fosfatázy, a to paralelně s dodržením stejných časových intervalů pro jednodušší interpretaci výsledků. Dále tedy pokračujeme se dvěma sériemi zkumavek. V jedné sérii určujeme aktivitu  $\beta$ -galaktozidázy pro různé koncentrace testované látky a ve druhé aktivitu fosfatázy.

### **Test na $\beta$ -galaktozidázovou enzymatickou aktivitu**

Do první série zkumavek umístíme po 0,1 ml bakteriální kultury inkubované s testovanou látkou a přidáme 0,9 ml P-puftru (fosfátový, pH 7,0), protřepeme, necháme 5 - 10 minut působit a zjišťujeme  $\beta$ -galaktozidázovou aktivitu přidáním 0,2 ml ONPG (4mg/1ml) do každé zkumavky. Protřepeme a při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  (v třepací vodní lázni) necháme probíhat enzymatickou reakci po dobu 10 - 90 minut do objevení zbarvení. Enzymatickou reakci zastavíme přidáním 0,6 ml 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Protřepeme. Měříme absorbanci proti kontrole. (Kontrolu pro nastavení přístroje tvoří vzorek, který neobsahuje žádnou zkoumanou látku, jinak všechny složky v objemech shodných s testem. Celou dobu je uchovávan v ledové tříšti, čímž jsou veškeré biochemické reakce i růst buněk minimalizovány.) Zbarvení stálé několik hodin.

### **Test na enzymatickou aktivitu alkalické fosfatázy**

Ke druhé sérii zkumavek s 0,1 ml bakteriální kultury s testovanou látkou přidáme 0,9 ml T-puftru (tris puftr, pH 8,8). Protřepeme, necháme 5 - 10 minut působit a přidáme 0,2 ml roztoku specifického substrátu pro fosfatázu PNPP (4mg/1ml). Necháme proběhnout enzymatickou reakci stejně jako v případě  $\beta$ -galaktozidázy (tj. 10 - 90 minut). Reakci zastavíme přidáním 0,3 ml 2M HCl a po protřepání necháme cca 5 minut stát. Nakonec přidáme 0,3 ml 2M trisu, aby změna pH neměla vliv na zbarvení vzorku. Zbarvení je pak stálé několik hodin. Měříme stejně jako u předcházejícího enzymu.

### **Měření**

V sériích zkumavek s ukončenou barevnou reakcí obou sledovaných enzymů provádíme měření optické density pomocí spektrofotometru při vlnové délce  $420 \pm 10 \text{ nm}$ .

### **Výpočet**

Do tabulky (protokolu o provedení testu) se zapíše hodnoty naměřené optické denzity u  $\beta$ -galaktozidázy ( $A_{420\text{Gal}}$ ) a alkalické fosfatázy ( $A_{420\text{Fos}}$ ) získané pro jednotlivé ředící úrovně. Pro výpočet se použijí průměrné hodnoty.

Míra specifické aktivity  $\beta$ -galaktozidázy ( $R_n$ ) se při daném postupu vypočítá pro každou ředící úroveň  $n$  jako poměr  $A_{(420Gal)_n}$  ku  $A_{(420Fos)_n}$ .

$$R_n = \frac{A_{(420Gal)_n}}{A_{(420Fos)_n}}$$

Indukční faktor ( $I_f$ ) je poměr mezi specifickou aktivitou  $\beta$ -galaktozidázy pro každou ředící úroveň  $n$  této látky a specifickou aktivitou  $\beta$ -galaktozidázy pro nulovou koncentraci sledované látky.

$$I_f(n) = \frac{R_n}{R_0}$$

### **Hodnocení výsledků**

Pro hodnocení sledované látky jako pozitivní (genotoxické) je třeba splnit dvě kritéria: (a) hodnota indukčního faktoru  $I_f > 1,5$  současně, (aa) se zvyšováním  $\beta$ -galaktozidázové aktivity s rostoucí koncentrací sledované látky.

### **7. Kritéria validity**

Test je považován za validní, je-li prováděn s bakteriální kulturou prověřenou na všechny vlastnosti, včetně účinku referenčních vzorků. Výsledky jsou hodnotitelné, pokud se v testu neprojeví toxický efekt sledované látky.

### **8. Presentace výsledků**

Výsledky jsou ukládány ve formě protokolů o provedení testu (příkladový protokol uveden dále), který obsahuje název a popis vzorku, datum provedení testu, testovací podmínky, naměřené výsledky a výsledky výpočtů.

Vložit tabulku schématické znázornění....

## Protokol o provedení SOS chromotestu

Název vzorku: \_\_\_\_\_ Datum provedení testu: \_\_\_\_\_  
 Alternativa testu: .....  
 Popis vzorku: \_\_\_\_\_ Doba inkubace gal.: \_\_\_\_\_  
 Výchozí kultura E.coli: \_\_\_\_\_ fosf.: \_\_\_\_\_  
 Vlastnosti E.coli: \_\_\_\_\_

Výsledky:

Množství vzorku	0					
Dávka/zk [ $\mu$ l]	0					
A <sub>420</sub> galak. 1						
A <sub>420</sub> galak. 2						
Ř						
A <sub>420</sub> fosf. 1						
A <sub>420</sub> fosf. 2						
Ř						
R <sub>n</sub>						
I <sub>f</sub>	1					

## Literatura

**Eder E., Deininger Ch.:** The role of alcohols as solvents in the genotoxicity testing of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones in the SOS chromotest, *Mutation Research* 470 (2000), 29-37

**Gebel T., Koenig A.:** Impact of dimethyl sulfoxide and examples of combined genotoxicity in the SOS chromotest, *Mutation Research* 444 (1999), 405-411

Hude von der W., Behm C., Gurtler R., Basler R.: Evaluation of the SOS chromotest, *Mutation Research* 203 (1988), 81-94

**Kevekordes S., Mersch-Sundermann V., Burghaus Ch.M.:** SOS induction of selected naturally occurring substances in *E. coli* (SOS chromotest), *Mutation Research* 445 (1999), 81-91

**Maron D.M., Ames B.N.:** Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research* 113 (1983), 173-215

Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Mochayedi S.: Sources of variability of the *Escherichia coli* PQ37 genotoxicity assay, *Mutation Research* 252 (1991), 51-60

**Mersch-Sundermann V., Klopman G., Rosenkranz H.J.:** Chemical structure and genotoxicity: studies of the SOS chromotest, *Mutation Research* 340 (1996), 81-91

**Ohta T., Nakamura N., Moriya M., Shirasu Y., Kada T.:** The SOS function inducing activity of chemical mutagenes in *Escherichia coli*, *Mutation Research* 131 (1984), 101-109

**Quillardet, P., Hofnung M.:** The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mutation Research* 147 (1985), 65-78

Quillardet, P., Hofnung M.: The SOS chromotest: a review, *Mutation Research* 297 (1993), 253-279

---

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

**Laboratoře genetické toxikologie**  
zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 378; fax: 267 082 378;  
e-mail: mcerna@szu.cz

## STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

### 12. Určení genotoxicity vody za použití umu-testu

**Původ metody:** Překlad ISO/CD 13829 - ISO/TC 147/SC5:N185

**Další platné normativy:**

Viz dokument ISO/TC 147/SC5:N146 - Analýza vody -  
Obecný návod pro biotesty vody a odpadní vody -  
Odběry, příprava, provedení, vyhodnocení

**Upozornění:**

*Test zahrnuje použití geneticky modifikovaných organismů. Jejich použití podléhá účinnosti Zákona 153/2000 Sb.*

**Pozn.:** *Uvedená metodika se zatím v rámci HS nepoužívá.*

Zpracoval: Prof. MUDr. Milena Černá, DrSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Metoda umožňuje detekci genotoxicity potenciálu vody a odpadní vody.

## **2. Definice:**

Test je založen na určení genotoxicity v testovaném vzorku, která zvyšuje expresi SOS-reparačního systému spojeného s umuC-genem, ve srovnání s kontrolou.

## **3. Princip metody:**

Testovacím organismem jsou geneticky upravené bakterie *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002

Bakterie jsou exponovány za kontrolovaných podmínek různým koncentracím testovaných vzorků. Test je založen na schopnosti genotoxických látek indukovat umuC operon u *Salmonelly* jako odpověď na genotoxické poškození DNA. V důsledku schopnosti reagovat na různé typy genotoxického poškození může jediný kmen detekovat různé druhy genotoxických látek.

Měřítkem genotoxického potenciálu testovaného materiálu je srovnání míry indukce umuC operonu působením testovaného vzorku k výsledkům spontánní aktivity. Protože umuC operon je spojen s genem lacZ pro  $\beta$ -galaktosidázu, indukce umuC operonu může být snadno detekována určením aktivity enzymu  $\beta$ -galaktosidázy.

## **4. Bezpečnost práce:**

Metodika vyžaduje práci s:

- karcinogeny a mutageny (referenční mutageny typu cyklofosfamid, azid sodný, benzo(a)pyren, 2-aminoantracen apod.),
- bakteriálním kmenem *Salmonella typhimurium*

### **Pozor: kmen používaný pro umu-test patří mezi GMO**

Je nutné dodržovat zásady předepsané pro práci v chemické a mikrobiologické laboratoři, používat pomůcky osobní ochrany (ochranný oděv, rukavice, roušky), dbát na zamezení kontaminace osob i prostředí, na zabránění úniku GMO z laboratoře a na likvidaci tekutého i pevného odpadu.

## **5. Chemikálie a spotřební materiál:**

Chemické látky mají být označeny jako vhodné pro analýzu. Všechny roztoky mají být připraveny v redestilované vodě nebo vodě odpovídající čistoty.



## **Základní chemikálie:**

Doplnit stejné pro Amese - referenční mutageny, kofaktory

HCl 1 mol/l

Hydroxid sodný 1 mol/l

DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sub>4</sub>)-Pozor, při stárnutí tvoří mutagenní produkty!!

## ***Kultivační média:***

TGA-medium

Frakce S9 jaterního homogenátu potkana (*viz Ames*)

## **6. Přístroje a pomocná zařízení:**

úchovné nádoby, 250 a 500 ml

pipety o objemech 1, 10, 25 ml

multikanálové pipety (8 kanálů) objemy 5 - 50 μl, 50 - 200 μl, 50 - 300 μl

rezervoáry pro nabíjecí multikanálové pipety (objemy 17 a 34 ml)

odměrné válce 500 ml

kryozkumavky

teploměr v rozsahu 25 - 30°C (±1°C)

teploměrem kontrolovaná vodní lázeň pro udržování a kultivaci bakteriální suspenze

inkubátor s časovým spínačem

inkubátor pro mikrodestičky, teplota +28°C a +37°C

třepačka, frekvence 125 - 150 rpm

autokláv

centrifuga

mikrodestičky s 96 plochými, průhlednými otvory, objem otvorů 380 μl

lepící překryvy na mikrodestičky

pH-metr

uv/vis fotometr, 1 cm kyvety

fotometr na mikrotitrační destičky

dělič na destičky

## **7. Pracovní postup:**

### **Příprava kultivačních médií:**

#### ***Kultivační medium (TGA-medium: trypton, glukosa, ampicilin)***

10 g tryptonu, 5 g NaCl a 11.9 g 4-(2-hydroxyetyl)-I-piperazinetansulfonové kyseliny (HEPES) rozpustit ve vodě, pH 7.0 ± 0.2, doplnit do 980 ml a autoklávovat 20 min při 121°C. Rozpustit 2 g D(+) glukosy (bezvodé) v 20 ml destilované vody a autoklávovat zvlášť. Po autoklávování smísit oba roztoky ve shodných objemech (v poměru 1:1) a přidat 50 mg ampicilinu do 1000 ml

chladného TGA media za sterilních podmínek. Pokud není roztok použit tentýž den, může být skladován rozdělen do menších nádobek při 20°C až 4 týdny.

### ***Koncentrované kultivační medium (10x TGA)***

Může být skladováno 14 dní při 4°C

#### ***Pro inkubaci bez S9***

Rozpustit 10 g tryptonu, 5 g NaCl a 11.9 g HEPES v 80 ml vody. Upravit pH na  $7.0 \pm 0.2$ . Rozpustit 2 g D(+) glukosy (bezvodé) v 20 ml vody. Autoklávovat oba roztoky odděleně po 20 min při 121°C, vychladit, smísit za sterilních podmínek a přidat 50 mg ampicilinu do 100 ml směsi za sterilních podmínek.

#### ***Pro inkubaci s S9***

Rozpustit 10 g tryptonu, 5 g NaCl, 2.46 g KCl, 1.63 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  a 11.9 g HEPES v 80 ml vody. Upravit pH na  $7.0 \pm 0.2$ .

Rozpustit 2 g D(+) glukosy (bezvodé) v 20 ml vody. Autoklávovat oba roztoky odděleně po 20 min při 121°C, vychladit, smísit za sterilních podmínek a přidat 50 mg ampicilinu do 100 ml směsi za sterilních podmínek.

#### ***B-pufř (pro lýzu buněk a pufřování reakcí)***

Rozpustit 20.18 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ , 5.5 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 0.75 g KCl, 0.25 g  $MgSO_4 \cdot 27 H_2O$  ve vodě. Upravit pH na  $7.0 \pm 0.2$ . Pak přidat 1.0 g sodiumdodecylsulfátu (SDS) a doplnit do 1000 ml. Před použitím přidat 0.27 ml 2-merkaptoetanolu do 100 ml B-pufřu a smíchat.

Lze skladovat ve tmě při pokojové teplotě.

#### ***Fosfátový pufř pH $7.0 \pm 0.2$***

Rozpustit 1.086 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$  a 0.538g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  v 100 ml vody.

Dle potřeby upravit pH na  $7.0 \pm 0.2$ , autoklávovat při 121°C.

Lze skladovat ve tmě při pokojové teplotě.

#### ***Roztok pro zastavení reakce***

Rozpustit 105.99 g  $Na_2CO_3$  ve vodě a doředit do 1000 ml.

Lze skladovat ve tmě při pokojové teplotě.

#### ***Roztok o-Nitrofenol- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG)***

Rozpustit 45 mg ONPG v 10 ml fosfátového pufřu. Látka se špatně rozpouští, roztok musí být připraven předem a míchán při pokojové teplotě ve tmě až do rozpuštění (nádoaba zabalená v alobalu) tj. asi 2 h.

#### ***S9 frakce jaterního homogenátu potkana***

**Příprava viz Amesův test.**

V den testu pomalu rozehrát (tj. ponořený v nádobě s ledovou tříští při 0°C a udržovat na ledu, před přidáním k prekultuře krátce protřepat. S9 frakci uchovávat při asi -80°C nebo i při menší. Standardní S9 je komerčně dostupná. *Prekultura je definována jako bakteriální kultura užitá k adaptaci bakterií na testovací podmínky a k růstu inokula pro testovací sérii.*

### ***Roztok kofaktorů***

Připravit roztok v den testu a uchovávat během testu na ledu.

Rozpustit 148 mg NADP (sodná sůl) a 76 mg glukoso-6-fosfátu (disodná sůl) v 5 ml 10x TGA (7.5.2)

### ***Referenční látky v DMSO***

Rozpustit 5 mg 4-nitrochinolin-1-oxidu (4-NQO) v 5 ml DMSO (může být zmrazený v porcích při -20°C) a naředit do 500 µg 4-NQO/L ze základního roztoku (x 10) směsí DMSO a vody v poměru 3 + 7 (= 30% DMSO)

Rozpustit 5 mg aminoantracenu (2-AA) v 5 ml DMSO (může být zmrazený v porcích při -20°C) a naředit do 2 mg 2-AA(L ze základního roztoku (x10) směsí DMSO a vody v poměru 3 + 7 (= 30% DMSO)

**Pozor:** DMSO může v průběhu skladování vytvářet mutagenní produkty.

### ***Příprava a úchova vzorků***

Voda a odpadní voda má být testována co nejdříve po odběru. Pokud to není možné ihned, vzorky mohou být skladovány při teplotě pod 4°C a vzorek musí být analyzován v průběhu 48 h. Lze použít zmrazení vzorku na teplotu nižší než -18°C, ne na delší dobu než 48 h a to podle ISO/DIS 5667-16. Ve výjimečných případech se použít další úpravy jako centrifugace a filtrace. To však může vést k eliminaci genotoxického materiálu (ISO/DIS 5667-16)

Zásadně se nedělá extrakce rozpouštědly a koncentrace!

PH vzorku má být 7.0±0.2 před inkubací. Upraví se přidáním co nejmenšího nezbytně nutného množství HCl (7.1) nebo NaOH (7.2) - netitrovat!. Změna pH a její možný vliv musí být zvážen (ISO/TC 147/SC5:n146).

### ***Interference***

Výsledky testu a jeho reprodukovatelnost mohou být změněny přítomností nerozpustných látek. U silně zbarvených nebo zakalených vzorků může dojít ke ztrátám absorpce při fotometrickém měření. V těchto případech je nutno použít testovaný vzorek jako slepý vzorek.

### **Vlastní postup**

#### **Testovací organismy:**

Salmonella typhimurium je gram negativní, fakultativně anaerobní bakterie z rodu Enterobacteriaceae. Salmonella typhimurium TA1535 je původní kmen.

Testovací organismus nese plazmid pSK1002 s umuC-lacZ genem a gen pro ampicilinovou rezistenci. Rezistence umožňuje snadnou selekci kmene. Označení kmene je TA1535/pSK1002.

### **Příprava a úschova zásobní kultury:**

Kmen v 150 µl kultivačního media s 10% DMSO nebo 20 - 50% glycerolu ve dvou ampulích při teplotě ne vyšší než -80°C. Pro přípravu celonoční kultury se použije pouze jedna ampule.

**Příprava celonoční kultury** (je definována jako kultura pro pomnožení bakterií pro prekultur) - provede se den před vlastním testem za sterilních podmínek:

Přidat 20 ml TGA kultivačního média do sterilní Erlenky za sterilních podmínek a uzavřít sterilní zátkou propustnou pro vzduch,  
rozmrazit zmrazenou zásobní kulturu,  
přidat 1 ml TGA média do ampule,  
centrifugovat bakterie v ampuli 10 min. při 2000 x g,  
slít supernatant,  
resuspendovat bakterie v 1 ml TGA média,  
naočkovat TGA médium v Erlence 0,5 ml bakteriální suspenze,  
inkubovat přes noc (ne déle než 12 h, použít časový spínač) za třepání při 37 ±1°C. Inkubaci musí být dosaženo zákalu alespoň 800 FNU (Formazine Nephelometric Units), jinak se kultura nemůže použít.

**Příprava inokula** (je definováno jako bakteriální suspenze použitá pro naočkování kultury a pro naočkování exponenciálně rostoucí prekultury v testovací sérii):

Naředit celonoční kulturu 1 : 10 čerstvým TGA médiem (tj. 1 objemová jednotka kultury + 9 objemových jednotek TGA media).

Inkubovat po cca 1 " h za třepání při teplotě 37 ±1°C. Poté změřit zákal (dle ISO-7027:1990) (optická densita při 600 nm ± 20 nm, kyveta 1 cm) a standardizovat za použití TGA media jako slepého roztoku na 340-350 FNU. Testovací organismus je nyní v exponenciální fázi a je připraven k použití. Test musí být zahájen během 10 minut.

### **Příprava testovací kultury bez přidání směsi S9:**

Během inkubace prekultury naředit vzorky a připravit testovací destičky. Pro každou koncentraci se test provádí trojmo dle následujícího schématu:

	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-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S	NC-S
H	RB	RB	RB	NC-RB	NC-RB	NC-RB	BL	BL	BL	BL	BL	BL

### Vysvětlivky:

S1 = vzorek 1 a příslušná ředění 1:1,5; 1:3; 1:6; 1:12

S2 - 6 = vzorky 2 - 6

NC-S = negativní kontrola vzorku

RB = referenční dávka (vzorek)

NC-RB = negativní kontrola referenční dávky (vzorku)

BL = slepý vzorek (blank)

- Do všech jamek mikroadestičky kromě A-F 1-3 se napipetuje 180 µl redestilované vody
- Do prvních třech jamek se dá 360 µl testovaného vzorku (vzorek 1 do řady A atd.)
- Vzorky se naředí v poměru 1:2 dle tabulky zleva doprava. Při ředění je nutno dbát na promíchání vzorku.
- Z posledních třech jamek se odebere 180 µl (A-F 10-12).
- Přidat 180 µl vody do jamek G, 1-12 (negativní kontrola)
- Přidat 180 µl vody do jamek H, 7-12 (slepý vzorek)
- Přidat 27 µl zásobního roztoku referenční látky (4-NQO) do jamek H1-H3 jako pozitivní kontrolu. Finální koncentrace v jamce je 50 ng/ml.
- Přidat 27 µl 30% roztoku vody a DMSO (směs DMSO a vody v poměru 3 + 7) jako další negativní kontrolu do jamek H4 – H6.
- Přidat 153 µl vody do jamek s referenčním vzorkem a negativní kontrolou (H1-H6).
- Přidat 20 µl 10x TGA do všech jamek (A-H, 1-12).

- k) Napipetovat 70  $\mu$ l prekultury (FNU 340-350) do jamek s testovanými vzorky (A-F, 1-12) a promíchat opakovaným naplněním a vyprázdněním pipety ve směru zprava doleva, tj. od nižší koncentrace k vyšší.
- l) Napipetovat 70  $\mu$ l inokula k negativním kontrolám a referenčním vzorkům (G, 1-12 a H, 1-6 a promíchat.
- m) Přidat 70  $\mu$ l TGA do jamek se slepými vzorky (H, 7-12) a promíchat.

#### **Příprava testovací kultury s přidáním směsi S9:**

Místo 4-NQO se použije 2-AA v 30% DMSO. Ředící postup je stejný, jako v předchozím postupu.

- a) Do každé jamky se přidá 20  $\mu$ l roztoku kofaktorů.
- b) Do 15 ml inokula (FNU 340-350) se přidá 450  $\mu$ l S9 (předem krátce protřepané) a směs se promíchá.
- c) 70  $\mu$ l této směsi s S9 se přidá do jamek s testovanými vzorky i do kontrol a promíchá opakovaným naplněním a vyprázdněním pipety.
- d) Pro přípravu slepého roztoku s S9 se přidá 45  $\mu$ l S9 (předem krátce protřepané) do 1,5 ml TGA. 70  $\mu$ l této směsi se umístí do jamek se slepým vzorkem (H, 7-12).

#### **Inkubace:**

Pro variantu bez S9 se použijí mikrodestičky A, B a C, jiné 3 mikrodestičky se použijí pro variantu s S9.

Po naplnění se mikrodestičky přikryjí uzávěrem.

Mikrodestička **A** se inkubuje po 2 h při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  na třepačce (120-150 rpm), kde je destička umístěna v úhlu  $45^\circ$  nebo na třepačce zabraňující sedimentaci bakterií a zajišťující, že nedojde ke zkřížené kontaminaci.

Na konci první inkubační fáze se naplní nová mikrodestička (**B**) TGA médiem, 270  $\mu$ l do každé jamky, uzavře se, aby nedošlo k odpaření obsahu a umístí do inkubátoru při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , aby se prohřála.

Z každé jamky destičky **A** se přenes 30  $\mu$ l do odpovídajících jamek destičky **B**, což znamená ředění 1:10.

Destička **B** se inkubuje stejným způsobem, jako předtím **A**, tj. 2 h při  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### **Měření:**

Měření optické denzity:

Po 2h inkubaci se měří bakteriální růst v destičce B ( $A_{600 \pm 20 \text{ nm}}$ ) fotometrem pro mikrodestičky.

### **Určení indukce umuC genu:**

Ihned po skončení inkubace se přidá do všech jamek nové destičky **C** 120  $\mu$ l B-pufre. Destička **C** se uzavře (zábrana odpaření obsahu) a předeřeje po dobu 10 min. při  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  v inkubátoru pro mikrodestičky.

Z každé jamky mikrodestičky **B** (zprava doleva, od nižší koncentrace k vyšší) se přidá 30  $\mu$ l do jamek destičky **C** naplněných B-pufrem. Ihned se přidá 30  $\mu$ l roztoku ONPG a dobře promíchá.

Destička se umístí do inkubátoru a inkubuje za třepání 30 min. při  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Po 30 min. se přidá do všech jamek 120  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a promíchá.

#### **Tím se reakce zastaví.**

Odstraní se bubliny proudem chladného vzduchu.

Ihned se měří finální absorpce fotometrem pro mikrodestičky při  $420 \pm 20$  nm.

Mikrodestičky **A** a **B** se dekontaminují autoklávováním.

### **Výpočet a vyjádření výsledků:**

Připraví se tabulka, do níž se zaznamená pro každou koncentraci, resp. pro ředící úroveň, naměřený zákal a hodnoty absorpce, indukce a vypočtené jednotky  $\beta$ -galaktosidázy a faktory biomasy (růstového faktoru).

Faktor biomasy (růstový faktor)  $G = (A_{600T} - A_{600B}) / (A_{600N} - A_{600B})$ ,

kde:

$A_{600T}$  je absorpce (průměrná hodnota) testovaného vzorku při  $600 \pm 20$  nm

$A_{600N}$  je absorpce (průměrná hodnota) negativní kontroly při  $600 \pm 20$  nm

$A_{600B}$  je absorpce (průměrná hodnota) slepého roztoku (blanku) při  $600 \pm 20$  nm

### **Výpočet aktivity $\beta$ -galaktosidázy v relativních jednotkách ( $U_T$ ):**

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

Obdobně jsou vypočteny jednotky negativních kontrol. Hodnoty referenčních vzorků mají být vztahovány k negativním kontrolám s rozpouštědlem.

Určení indukčního poměru IR:

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

kde:

$A_{420T}$  je extinkce (průměrná hodnota) testovaného vzorku při  $420 \pm 20$  nm,

$A_{420N}$  je extinkce (průměrná hodnota) negativní kontroly, resp. referenčního vzorku při  $420 \pm 20$  nm,

$A_{420B}$  je extinkce (průměrná hodnota) slepého vzorku při  $420 \pm 20$  nm.

### **Indukční poměr IR < 1,5:**

Nejnižší hodnota D (ředící hladina), při níž indukční poměr < 1,5 je měřen za daných testovacích podmínek, platí jako výsledek (Příloha 1).

Pokud se naměří rozdílné indukční poměry po inkubaci s a bez S9, pak se za výsledek bere vyšší z obou hodnot.

### **Přesnost:**

(data jsou odvozena z německých kruhových testů ve shodě s DIN metodou)

<b>Vzorek</b>	<b>I</b>	<b>n</b>	<b>OP (%)</b>	<b>VCR (%)</b>
Vzorek 1 - 8 (průměr) -S9	10	140	5	17,5
Vzorek 1 - 8 (průměr) +S9	10	134	2,1	24,8

Kde:

I = počet laboratoří (po vyloučení vybočujících)

n = počet měřených hodnot (po vyloučení vybočujících)

OP = vybočující, v procentech

VCR = reprodukovatelnost, variační koeficient, v procentech

<b>Vzorek</b>	<b>VCr (%)</b>	<b>X, IR&gt;1,5</b>	<b><math>\sigma_r</math></b>	<b>VCR (%)</b>
4-NQO	4,36	2,404	0,358	14,91
2-AA +S9	5,73	2,512	0,445	17,73
vzorek 1	4,82	3,174	0,636	20,03
vzorek 2	6,83	7,422	0,826	11,13
vzorek 3	2,54	6,006	0,753	12,54

Kde:

VCr = variační koeficient opakovatelnosti v procentech

X = průměr IR (indukční poměr)

$\sigma_r$  = standardní odchylka opakovatelnosti

VCR = reprodukovatelnost, variační koeficient, v procentech

## **8. Kritéria validity**

Test je považován za validní, pokud referenční vzorky za daných testovacích podmínek dosahují hodnoty indukčního poměru IR nejméně 2.

Výsledky nejsou hodnotitelné, pokud je faktor biomasy (růstový faktor) < 0,5.

Minimální hodnota faktoru biomasy v negativních kontrolách (G, 1-12) na destičce **B** je 140 FNU.



## **9. Prezentace výsledků**

Protokol má obsahovat následující údaje:

### **Identifikace testovaného materiálu**

*Příprava vzorku:*

úprava pH  
způsob a doba skladování vzorku  
podmínky centrifugace  
filtrace  
homogenizace  
užití rozpouštědel

Testovací organismus (typ, kmen), datum provedení testu

### **Testovací podmínky**

Sdělení výsledků  
hodnota D (příloha 1),  
naměřené hodnoty A600 a A420,  
tabulkové vyjádření ředění látek, které mají být měřeny,  
průměrné hodnoty indukčních poměrů,  
růstové faktory,  
hodnoty A600 a A420, poměr A420 / A600,  
standardní chyba

### **Charakteristiky provedení:**

možné odchylky od předepsaného postupu,  
další účinky (zákal, rozpustnost, precipitace,  
procedurální charakteristiky

## Příloha 1 (informativní)

**Tabulka 1: Složení testovaných a kontrolních vzorků**

<b>Testované vzorky</b>					
Ředění vzorku vodou	Ředící úroveň D	Testovaný vzorek (μl)	Ředící voda (μl)	10 x TGA (μl)	Inokulum (μl)
1 : 1,5	1,5	180	-	20	70
1 : 3	3	90	90	20	70
1 : 6	6	45	135	20	70
1 : 12	12	22,5	157,5	20	70

<b>Kontrolní vzorky</b>						
	Testovaný vzorek (μl)	Referenční vzorek (μl)	Ředící voda (μl)	10 x TGA (μl)	Inokulum (μl)	1xTGA (μl)
Slepý vzorek bez bakterií	-	-	180	20	-	70
Negativní kontrola	-	-	180	20	70	-
Referenční vzorek	-	180	-	20	70	-

Pozn.: Ředění vzorku vodou 1:1,5 = 1 díl v 1,5 atd.

**Tabulka 2: Finální protokol pro umu-test**

Vzorek/ředící krok (A-F, 1-12) <b>D</b>		S9	Faktor biomasy <b>G</b>	Indukční poměr <b>IR</b>
1,5	původní vzorek	-S9		
3	1 pův. + 2 voda	-S9		
6	1 pův. + 5 voda	-S9		
12	1 pův. + 11 voda	-S9		
1,5	původní vzorek	+S9		
3	1 pův. + 2 voda	+S9		
6	1 pův. + 5 voda	+S9		
12	1 pův. + 11 voda	+S9		
<b>Pozitivní kontrola</b>				
4-NQO	50 ng 4-NQO/ml	-S9		
2-AA	200 ng 2-AA/ml	+S9		

Poznámka:

V ředícím kroku 1 (původní vzorek) je vzorek již ředěn médiem a reagenty 1 : 1,5.

Nejnižší hodnota D (původní vzorek) = 1,5

Hodnota D, při níž je naměřen za daných testovacích podmínek indukční poměr  $< 1,5$ , je vyjadřován jako výsledek ( $D_{IR 1,5}$ ).

Pokud je po přidání S9 zjištěn jiný indukční poměr, pak se za konečný výsledek pokládá vyšší z obou hodnot ( $D_{IR 1,5}$ ).

### **Nejnižší neúčinné ředění (LID, lowest ineffective dilution)**

Je nejnižší D hodnota ředící série, při níž je naměřen indukční poměr  $< 1,5$ . Indikátorový kmen *Salmonella typhimurium* **TA 1535/pSK1002** je dostupný ve Sběrce mikroorganismů Německé spolkové republiky (DSM), Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig, SRN, katalogové číslo 9274.

## **Literatura:**

**Oda, Y., Nakamura, S.I., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H.:** Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.*, 147, 1985, 219-229

**Whong, W-Z., Wen, Y-F., Steward, J., Ong. T.:** Validation of the SOS/Umu test with mutagenic complex mixtures. *Mutation Res.*, 175, 1986, 139-144

**Nakamura, S.I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., Sugimoto, K.:** SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002: examination with 152 chemicals. *Mutation Res.*, 192, 1987, 239-246

**Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y., Zahn, R.K.:** A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutation Res.*, 253, 1991, 215-222

**Rao, S.S., Burnison, B.K., Efler, S., Witekind, E., Hansen, P-D., Rokosh, D.A.:** Assessment of genotoxic potential of pulp mill effluent and an effluent fraction using Ames mutagenicity and umu-C genotoxicity assays. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10, 1995, 301-305

---

Státní zdravotní ústav  
Centrum hygieny životního prostředí - Laboratoře genetické toxikologie  
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

### **Laboratoře genetické toxikologie**

zkušební laboratoř č. 1206.2 akreditovaná ČIA  
tel: 267 082 372; 267 082 320; fax: 267 082 378;  
e-mail: [jiri.smid@seznam.cz](mailto:jiri.smid@seznam.cz); [bbenes@szu.cz](mailto:bbenes@szu.cz)

## **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

### **13. Stanovení kreatininu ve vzorcích moči**

**Původ metody:** Szadovski, D., Jörgensen, A., Essing, H.G., Schaller, K. H.:  
Die kreatinineliminationsrate als Bezugsgröss für Analysen  
aus Harnproben. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8,  
529 - 533, 1970.

Zpracoval: Ing. Jiří Šmíd, RNDr. Bohuslav Beneš, CSc.

## **1. Předmět a vymezení působnosti**

Postup umožňuje stanovit hladinu kreatininu ve vzorcích lidské moče.

## **2. Definice**

Znalost koncentrace kreatininu v moči je nezbytná pro standardizaci objemu moče analyzovaných vzorků.

## **3. Princip**

Ke stanovení se využívá Jaffeho reakce (modifikované dle Szadkovski et al. - viz literatura), kdy kreatinin vytváří s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí (NaOH) oranžové zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci kreatininu.

## **4. Bezpečnost při práci**

Vzhledem k manipulaci s potenciálně infekčním materiálem je nutno při práci používat ochranných rukavic a automatických pipet (ev. skleněných pipet s balónkem). V laboratoři musí být k dispozici účinný dezinfekční prostředek (např. Persteril, Chloramin T). Tímto prostředkem se po každé práci umývají pracovní plochy. Vzhledem k toxicitě kyseliny pikrové a práci s hydroxidem sodným je nutno dodržovat pravidla pro práci s jedy a žiravinami.

## **5. Chemikálie a spotřební materiál**

kyselina pikrová p. a.

hydroxid sodný p. a.

kreatinin p. a.

destilovaná nebo demineralizovaná voda

laboratorní sklo ( zkumavky, kádinky, pipety, lodičky) borosilikátové

automatické pipety

## **6. Přístroje a pomocná zařízení**

spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou na 520 nm

zařízení pro přípravu demineralizované nebo destilované vody.

analytické váhy

## **7. Pracovní postup**

### **Příprava základních roztoků**

**Nasycený roztok kyseliny pikrové:** do zvoleného objemu (s výhodou 500 ml) demineralizované nebo destilované vody se vnáší po dobu 24 hodin kyselina

pikrová, za občasného promíchání a laboratorní teploty, až se další podíly nerozpouští. Poté se zfiltruje.

10% roztok hydroxidu sodného: do 100 ml odměrné baňky se naváží 10 g NaOH p.a. a doplní destilovanou vodou na 100 ml.

**Kyselina chlorovodíková 0,1mol/l:** do 100 ml odměrné baňky se napipetuje 0,85 ml 37% HCl a doplní do 100 ml destilovanou vodou.

**Základní roztok kreatininu:** 0,2262 g kreatininu p.a. (mol. hmotnost 113,12) se rozpustí v odměrné baňce o objemu 50 ml v 0,1mol/l HCl a objem doplní na 50 ml. Výsledná koncentrace je rovna 40 mmol kreatininu/l.

**Reakční činidlo:** těsně před použitím se smíchá nasycený vodný roztok kyseliny pikrové s 10% vodným roztokem NaOH v poměru 10 : 0.75 a dobře promíchá. Množství se volí dle celkového počtu vzorků (vlastní vzorky, kalibrace, slepý vzorek, referenční materiál).

Spotřeba činidla na 1 vzorek = 2 ml.

**Pracovní roztoky kreatininu** - do jednotlivých zkumavek se pipetuje základní roztok kreatininu dle následujícího schématu a doplní 0.1 mol/l HCl do 10 ml

ml základního roztoku	mmol/l	mg/l
1,0	4,0	452,5
2,0	8,0	904,9
3,0	12,0	1357,5
3,5	14,0	1583,7
4,0	16,0	1810,0
5,0	20,0	2262,5
6,0	24,0	2715,0
7,0	28,0	3167,5

### **Postup stanovení kreatininu pomocí standardních roztoků**

20  $\mu$ l moče nebo roztoku standardu (14 mmol/l = 1583,7 mg/l) se ve zkumavce smíchá s 2 ml čerstvě připraveného činidla (max. 60 min), dobře se promíchá a po 10 minutách se přidají 3 ml destilované vody, opět se dokonale promíchá a po 5 minutách stání při laboratorní teplotě se měří absorbance roztoku při **520 nm** proti slepému vzorku (pokusu). Slepý vzorek se připraví tím způsobem, že se místo 20  $\mu$ l moče použije 20  $\mu$ l destilované vody. Ke každé sérii vzorků se analyzují 2 standardy o známé koncentraci (s výhodou 14 mmol/l). Mez detekce = 50 mg/l = 0,44 mmol kreatininu/l.

## Postup stanovení kreatininu pomocí kalibrační křivky

Z připravených pracovních roztoků kreatininu např. o koncentraci 4 - 12 - 16 - 20 - 24 mmol/l se pipetuje 20 µl do zkumavek s 2 ml reakčního činidla, dobře se promíchá a po 10 minutách přidá 3 ml destilované vody, opět se promíchá a po 5 minutách stání se měří absorbance při 520 nm proti slepému vzorku. Naměřené hodnoty absorbance se vynesou na osu pořadnic (y) grafu, proti hodnotám koncentrací na ose úseček (x).

Rozsah stanovovaných koncentrací kreatininu v lidské moči, odpovídá rozsahu hodnot koncentrací kalibrační křivky (4 - 28 mmol/l, resp. 452 - 3167 mg/l). V případě nalezení vyšších hodnot koncentrací u jednotlivých sledovaných vzorků se tyto ředí v poměru 1:1 dest. H<sub>2</sub>O a stanovení se opakuje.

Výpočet koncentrace kreatininu stanovené pomocí standardních roztoků

$$C_{\text{vzorku}} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}} \cdot C_{\text{standardu}} \quad (\text{mmol/l resp. mg/l})$$

kde je :

$C_{\text{vzorku}}$  = koncentrace kreatininu v měřeném vzorku

$A_{\text{vzorku}}$  = naměřená absorbance vzorku

$C_{\text{standardu}}$  = koncentrace kreatininu v standardním roztoku

$A_{\text{standardu}}$  = naměřená absorbance standardního roztoku

## **9. Kontrola kvality**

Provádí se pomocí stanovení kreatininu v roztocích o známé koncentraci nebo stanovením kreatininu v referenčních materiálech (moč). Lze doporučit referenční materiál CZ 6007, připravený v SZÚ a certifikovaný Českým metrologickým institutem.

## **Literatura**

**Szadovski, D., Jörgensen, A., Essing, H. G., Schaller, K. H.:** Die kreatinineliminationsrate als Bezugsgröss für Analysen aus Harnproben. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, 529 - 533, 1970

---



## **LABORATOŘ GENETICKÉ EKOTOXIKOLOGIE**

**Vedoucí: MUDr. Radim Šrám, DrSc.**

Zdravotní ústav se sídlem v Kolíně, pobočka Praha

a

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha  
tel: 241 062 675, e-mail: [bbinkova@biomed.cas.cz](mailto:bbinkova@biomed.cas.cz)

### **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

#### **14. Stanovení DNA aduktů polyaromatických látek metodou <sup>32</sup>P - postlabelingu**

Zpracoval: RNDr. Blanka Binková, CSc.

## OBSAH

1. Princip stanovení DNA aduktů metodou  $^{32}\text{P}$ -postlabelingu
2. Referenční materiály a omezení metody
3. Odběr vzorků
4. Izolace DNA
5. Hydrolýza DNA
6. Butanolová extrakce obohacování DNA aduktů
7. Nuclease P1 pro obohacování DNA aduktů
8. Značení DNA aduktů pomocí  $^{32}\text{P}$ -ATP
9. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) k separaci DNA aduktů
10. Vyhodnocování chromatografických map DNA aduktů
11. Stanovení celkové koncentrace nukleotidů pomocí HPLC
12. Výpočet hladin DNA duktů.

### 1. Princip stanovení

#### **DNA aduktů polyaromatických látek („bulky aromatic adducts“) metodou $^{32}\text{P}$ -postlabelingu**

Princip metody sestávající z několika následných biochemických reakcí je schematicky znázorněn na obr.1. DNA izolovaná z tkáně nebo buněk je nejprve enzymaticky hydrolyzována působením směsi enzymů (mikrokokální nukleáza a fosfodiesteráza) na nukleosid-3'-monofosfáty. Dalším krokem je separace modifikovaných nukleotidů od nukleotidů intaktních, která není nikdy dokonalá, a proto bývá označována jako obohacování aduktů. Jedna varianta využívá k oddělení aduktů extrakce do butanolu, druhá specifické enzymové aktivity nukleázy P1, která odštěpuje zbývající fosfát z nukleosid-3'-monofosfátu preferenčně u normálních nukleotidů. Vzniklé nukleosidy nejsou pak špatným substrátem pro T4-polynukleotidkinázu, která přenáší radioaktivní fosfát z adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na nukleosid-3'-monofosfáty. Dalším krokem je značení radioaktivním fosforem. Ten je přenesen ve formě fosfátu z [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (přítomen v molárním nadbytku) na 5'-hydroxylový konec modifikovaných nukleotidů působením T4-polynukleotidkinázy. Vzniká nukleosid-3',5'-bifosfát. Takto označené adukty jsou v dalším postupu děleny vícerozměrnou tenkovrstvou chromatografií (TLC) s použitím polyethylenimin-celulosových folií. Chromatografie ve směrech D1, D2 a D5 se používá k odmytí nežádoucích radioaktivních komponent pro dosažení optimálního pozadí. Chromatografie D3 a D4 s mobilní fází o vysoké iontové síle, s kyselým (D3) resp. alkalickým (D4) pH, slouží k rozdělení aduktů s rozdílnou pohyblivostí za daných chromatografických podmínek, která je určována jejich chemickou strukturou. Separace aduktů je závislá nejenom na celkové iontové síle, ale i na pH, koncentraci močoviny a povaze aniontů. Vyvolané chromatogramy jsou

vyhodnocovány autoradiograficky s použitím citlivého filmu a délkou expozice 1-5 dnů při  $-80^{\circ}\text{C}$  pro detekci 1 aduktu v  $10^8$ - $10^{10}$  nukleotidech. Radioaktivita se měří na scintilačním spektrometru. Koncentrace DNA aduktů se vyjadřuje počtem aduktů na  $10^8$  nukleotidů. Tyto hodnoty mohou být snadno převedeny na veličinu fmol aduktů / $\mu\text{g}$  DNA (1 adukt/ $10^7$  nukleotidů = 0.3 fmol aduktů / $\mu\text{g}$  DNA).

## **2. Referenční materiály a omezení metody**

- a) **B(a)P-DNA standard**, 4 adukty/ $10^8$  nukleotidů, LGE
- b) **B(a)P-DNA standard**, 50 aduktů/ $10^8$  nukleotidů, IARC, Lyon, Francie
- c) **anti-BPDE- DNA standard**, 17 aduktů/ $10^8$  nukleotidů, LGE

*Pro tuto metodu neexistují komerčně vyráběné standardy DNA aduktů. Každá laboratoř si potřebné standardy musí připravit sama.*

**Standard a)** byl připraven izolací DNA z jater krysy, které bylo perorálně aplikováno 100mg B(a)P/kg tělesné hmotnosti.

**Standard b)** byl získán od Dr. Castegnaro, International Agency for Research on Cancer v rámci projektu „Standardisation of  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling methods: Interlaboratory Trial“ (D. H. Phillips, M. Castegnaro, Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: Report of interlaboratory trials and production of recommended protocols, Mutagenesis 14 (1999) 301-315), kterého se zúčastnila i naše laboratoř.

**Standard c)** byl připraven reakcí anti-BPDE (benzo[a]pyrene-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxide[ $\pm$ ], NCI, Midwest Research Institute, USA) s CT (Calf Thymus) DNA (Sigma, D-1501)

Standardy jsou uchovávány v alikvótech (20  $\mu\text{l}$ ) při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Používají se při každém postlabelingovém experimentu pro kontrolu všech postupů, které budou dále podrobně uvedeny.

Pro kontrolu možné kontaminace v jednotlivých postupech provádíme v každém experimentu všechny procedury současně s blankovými vzorky (místo DNA alikvót HPLC vody), které vyhodnocujeme pro korekci pozadí (kap. 12).

Používané chemikálie, enzymy, materiály a přístroje jsou uvedeny u jednotlivých postupů.

$^{32}\text{P}$ -postlabeling mohou provádět jen pracovníci, kteří jsou oprávněni pro práce se zdroji ionizujícího záření a obeznámeni s bezpečnostními předpisy pro práce v izotopové laboratoři. Objednávky, výdej, evidence radiochemikálií a zacházení s odpady podléhají předpisům vydaným centrálním pracovištěm krčského areálu AV ČR

## Odběr vzorku

### Odběr krve a izolace lymfocytů a/nebo celkových bílých krvinek (WBC)

Odběr krve se provádí podle standardních postupů pomocí vacutainerů s Na-heparinem (objem 9 ml). Krev lze před izolací lymfocytů a/nebo WBC uchovávat v chladničce při 4 - 10°C, nejdéle však 24 h.

**Při izolaci lymfocytů nebo WBC dodržujeme předpisy pro práci s infekčním materiálem.**

### 3. Chemikálie a materiál

Chemikálie Sigma, analytical grade

Ficoll-Paque TM Plus (Pharmacia, Biotech)

Vacurette Sodium Heparin objem 9 ml, (Greiner Labortechnik, GmbH)

50 ml LeucoSep tubes (Greiner Labortechnik, GmbH)

#### **Roztoky:**

**Roztok (A):** 0.16 M  $NH_4Cl$  (M.W. 53.49): 8.3 g/l

**Roztok (B):** 0.17 M Tris, pH = 7.6 (M.W.121.1): 20.6 g Tris/l

pH nastavíme na 7.6 pomocí HCl.

**Lýzovací roztok pH=7.2** připravujeme **vždy čerstvý** smícháním roztoku A a B v poměru 9 : 1 a nastavením pH na 7.2 pomocí HCl.

**Fyziologický roztok** - 0.9% NaCl: 9 g/l

### 5. Potřebné přístroje:

pH-metr Beckman

centrifuga Jouan MR22

chladnička

mrazící box do - 80°C

### **Postup izolace WBC**

1. Krev zcentrifugujeme (10 min, 800g, 24°C).
2. Pomocí umělohmotné pastěrky odebereme opatrně vrstvu WBC (na rozhraní mezi plazmou a RBC) spolu s malou přiléhající vrstvou červených krvinek (cca 1 cm vrstvou) a přeneseme do plastických centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml se šroubovacím uzávěrem.
3. Přidáme cca 10 ml čerstvě připraveného lýzovacího roztoku, promícháme a necháme stát při teplotě místnosti 40-60 min (probíhá lýza červených krvinek). Zcentrifugujeme ve stejné centrifuze (800g, 10 min) a supernatant odsajeme.

4. Pokud je zřetelná kontaminace peletu WBC červenými krvinkami, lýzování opakujeme min. 2x. Nakonec pelet WBC promyjeme 2 x fyziologickým roztokem o objemu 12-15 ml.
5. Pokud nebudeme provádět izolaci DNA bezprostředně, pelet WBC zamrazíme ve stejných zkumavkách, v nichž probíhala izolace a uchováváme v mrazícím boxu při - 80°C.

### **Postup izolace lymfocytů**

1. Napipetujeme 15 ml Ficollu (temperovaného předem na teplotu místnosti) do 50 ml LeucoSep zkumavek a krátce zcentrifugujeme (400g, 30 sec). Ficoll je nyní pod dělicím porézním diskem.
2. Krev ze dvou vacutainerů (~ 15 ml krve) přidáme do takto připravených zkumavek a centrifugujeme 25 min, 400g při teplotě 24°C. Výsledné rozdělení v LeucoSep zkumavkách od shora je následující: plazma - lymfocyty - ficoll - porézní disk - ficoll - erytrocyty.
3. Pomocí umělohmotné pastěrky odebereme kvantitativně vrstvu lymfocytů do plastických centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml se šroubovacím uzávěrem a přidáme fyziologický roztok do objemu ~ 15 ml. Zcentrifugujeme (650g, 10 min, 24°C) a supernatant odsajeme. Promývání lymfocytů fyziologickým roztokem opakujeme 2 krát (jako u kroku 3).
4. Pokud nebudeme provádět izolaci DNA bezprostředně, pelet LYM zamrazíme ve stejných zkumavkách, v nichž probíhala izolace a uchováváme v mrazícím boxu při - 80°C.

### **Odběr a zacházení s tkáněmi**

K analýze DNA aduktů se také využívá DNA izolovaná s tkání, např. z placent nebo tkání odebraných při chirurgických zákrocích. Odběry tkání provádí nemocniční personál. Tkáně je nutno okamžitě po odběru zamrazit, nejlépe kapalným dusíkem. Není-li k dispozici, uloží se okamžitě do mrazícího boxu na -20°C a transportují se suchým ledem do LGE, kde jsou tkáně uchovávány v mrazícím boxu při - 80°C až do izolace DNA.

### **Izolace DNA**

Izolaci DNA provádíme buď z čerstvě izolovaných buněk a tkání nebo ze zamražených vzorků (viz. kap. 2) okamžitě po jejich rozmražení. Vzorky izolované DNA řádně označené typem studie, číslem vzorku, koncentrací DNA a datumem izolace uchováváme v mrazícím boxu při -80°C.

**Extrakci provádíme v digestoři vzhledem k vysoké toxicitě fenolu a dodržujeme předpisy o zacházení s toxickými organickými odpady.**

## Roztoky

**Extrakční pufr:** 1 % SDS, 10 mM EDTA, 20mM Tris

Pro přípravu 1 l roztoku (uchováváme při teplotě místnosti):

2,42 g Tris (M.W 121.1)

3,723 g EDTA (M.W.372.3)

10 g Sodiumdodecylsulphate-SDS (M.W.268.4)

**1 M Tris, pH=8** (uchováváme při teplotě místnosti)

12,1 g/100 ml H<sub>2</sub>O, pH nastavujeme pomocí HCl

**5M NaCl** (uchováváme při teplotě místnosti)

29,23 g/100 ml H<sub>2</sub>O

**50 mM Tris, pH 7.4**, k přípravě roztoků CIP a CI

1.21 g/200 ml, pH nastavujeme pomocí HCL

**CIP - chloroform : izoamylalkohol : fenol (24 : 1 : 25)**

250 g fenol, redestilovaný, Aldrich, Cat.No. 32,811-1

240 ml chloroform

10 ml izoamylalkohol

Fenol rozpustíme ve vodní lázni při 50°C. Po rozpuštění všechny složky smícháme a důkladně protřepeme s 80 ml 50 mM Tris pH=7.4 (nasycení směsi CIP Trisem) a směs necháme stát přes noc. Nadbytek roztoku Trisu vytvoří vrstvu na povrchu CIP směsi.

**CI - chloroform : izoamylalkohol (24 : 1)**

240 ml chloroform

10 ml izoamylalkohol

Smícháme a protřepeme s 80 ml 50 mM Tris pH=7.4 (viz. CIP)

**RNA mix = Ribonuclease A (Sigma, R-5125) 10mg/ml, Ribonuclease T1 (Sigma R-1003) 5000 U/ml**

Připravíme roztok RNAzy-A 10mg/ml v 50 mM Tris pH=7.4. Zahřejeme na 80°C po dobu 10 minut a necháme vychladnout. 1 ml tohoto roztoku přepipetujeme do ampulky s RNAzou-T1 (5000 U/ampulka) a jemně promícháme. Rozpipetujeme po menších alikvotech (200 µl) a uchováváme v mrazícím boxu při -20°C.

**Proteinaza K (20 mg/ml H<sub>2</sub>O)**

Roztok připravujeme vždy před použitím čerstvý.

## Potřebné přístroje

spektrofotometr Shimadzu 2000, Japonsko

pH-metr, Beckman

centrifuga Savant HSC 10K

vodní lázeň

pístový homogenizér POTTER S, Braun

vakuový centrifugační odpařovač Jouan RC 10.22  
třepačka s výměnnými nástavci IKA-VIBRAX VXR, typ VX 2 (Janke&Kundel, GmbH)

### Postup izolace DNA

1. Izolované buňky (WBC, LYM) po rozmražení nebo čerstvý pelet buněk resuspendujeme v 1.5 ml extrakčního pufru (1% SDS, 10 mM EDTA, 20 mM Tris). Tkáň pomocí pinzety a chirurgických nůžek zhomogenizujeme v extrakčním pufru (cca 200 mg/ml) a 1.5 ml homogenátu přeneseme do 15 ml plastických zkumavek s uzávěrem.
2. Přidáme **30  $\mu$ l RNA-mix** (10 mg/ml RNAza A, 5000 U/ml RNAza T), jemně promícháme a inkubujeme 1,5 hodiny v lázni 37°C.
3. Přidáme **30  $\mu$ l proteinázy K** (20 mg/ml, čerstvě připraveno před použitím), promícháme a inkubujeme 2 hodiny při 37°C.
4. Po skončení inkubace směs přeneseme pomocí umělohmotných jednorázových pasterek (na každý vzorek nová pasterka) do 5 ml umělohmotných zkumavek a ke každému vzorku přidáme **75  $\mu$ l M Tris, pH=8, 150  $\mu$ l 5M Na Cl a 1.5 ml CIP**. Zazátkujeme a intenzivně protřepeme ručně 100x (nebo na vortexu alespoň 2 minuty). Zcentrifugujeme na centrifuze SAVANT při 3000 ot/min (1500 g) po dobu 5 minut .
5. Odebereme *vrchní vodnou fázi* do nově připravených 5 ml zkumavek, vždy novou špičkou pro každý vzorek, a přidáme **1.5 ml CI**. Zazátkujeme, opět intenzivně protřepeme a zcentrifugujeme (jako v kroku 4).
6. Odebereme *vrchní vodnou fázi* do nových 5 ml zkumavek a přidáme **150  $\mu$ l 5M NaCl a 1.5 ml ledového absolutního etanolu**. Zkumavky zazátkujeme. Při pomalém otáčení zkumavky dojde k vysrážení DNA. Opět zcentrifugujeme (jako krok 4). Odsajeme ethanol a zkumavku vysušíme ve vakuovém odpařovači.
7. Pelet DNA rozpustíme v přiměřeném objemu deionizované H<sub>2</sub>O podle množství vysrážené DNA (optimální výsledná koncentrace 0.8 - 1.5 mg/ml (max. 2.0 mg/ml). DNA necháme rozpouštět přes noc při teplotě místnosti za kontinuálního protřepávání.
8. Po rozpuštění DNA, změříme na spektrofotometru její koncentraci (program „DNAKONCENTRACE“). Použijeme křemenné mikrokyvety o objemu 1 ml (v případě nízké výtěžnosti DNA ultra-mikrokyvety o objemu 200  $\mu$ l). Před měřením vynulujeme přístroj (autozero) s vodou v měrné i referenční kyvetě. Do měřicí kyvety pipetujeme vždy 5  $\mu$ l vzorku DNA a 995  $\mu$ l deionizované vody. Referenční kyveta obsahuje jen deioniz. vodu. V tomto případě absorbance při 260 nm násobená deseti udává koncentraci DNA v  $\mu$ g/ $\mu$ l. V případě koncentrací  $>$  2.0  $\mu$ g/ $\mu$ l vzorek naředíme a měření opakujeme.
9. Po změření koncentrace DNA vzorky přepipetujeme do 1.5 ml ependorfeků (používáme vždy nové špičky!!!) a označíme štítkem s popisem studie,

číslem vzorku, koncentrací DNA a datem izolace. Vzorky pak zamrazíme a uložíme do mrazícího boxu na -80°C.

10. Údaje o vzorcích DNA evidujeme na počítači v programu EXCELL pro každý projekt v samostatném souboru.

### **Hydrolyza DNA**

Tímto postupem se zahajuje vlastní postlabelingový experiment, který trvá 1-2 týdny, podle typu a počtu vzorků DNA vybraných pro experiment. Současně lze v jednom experimentu analyzovat 30, max. však 100 vzorků DNA (závisí na zručnosti a zkušenostech pracovníka). V tomto kroku je DNA enzymaticky hydrolyzována působením směsi enzymů (mikrokokální nukleáza a fosfodiesteráza) na nukleosid-3'-monofosfáty.

### **Chemikálie**

Micrococcal nuclease (MN, Sigma N 3755; 1 bal MN = 200 U)

Spleen phosphodiesterase (Boehringer Mannheim 108251; 2 bal á 2 mg)

Ostatní Sigma (analytical grade)

Dialyzační trubička Spectopor 6.4 mm

Třepačka s výměnnými nastavci IKA-VIBRAX VXR, typ VX 2 (Janke&Kundel, GmbH)

### **Roztoky**

#### ***MN/SPD mix: 50 U MN/ml a 1mg SPD/ml (odpovídá 2 U/ml)***

Suspenzi SPD (1 balení obsahuje 2 mg SPD v 1 ml) před přípravou mixu přepipetujeme do dialyzační trubičky dlouhé cca. 12 cm (Spectopor tubing 6.4 mm), kterou na obou koncích fixujeme dialyzačními svorkami. Ty umístíme co nejblíže k objemu SPD, abychom zabránili nadměrnému zvětšení objemu při dialýze (max. do 2 ml). Totéž provedeme i s druhým balením SPD. Obě dialyzační trubičky ponoříme do 2 l HPLC vody v kádince a dáme na 2 h do lednice. Po 2 h vodu v kádince vyměníme a necháme další 2 h dialyzovat. Po skončení dialýze přeneseme objem SPD z obou dialyzačních trubiček do malé kádinky a doplníme na celkový objem 4 ml. Tento objem přepipetujeme do lahvičky s MN (1 bal MN=200U) a celý obsah lahvičky po zazátkování opatrně promícháme. Po rozpuštění MN obsah MN/SPD mix rozpipetujeme (aliquóty 200 a 500) do 1.5 ml ependorfech s popisem a datem přípravy.

Alivóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20°C (max. však 4 měsíce).

#### ***Hydrolyzační pufr***

100 mM Na Succinate pH=6.0

50 mM CaCl<sub>2</sub>

Pro přípravu 100 ml roztoku:



2.7 g Na Succinate (M.W.= 270.1,  
0.368 g CaCl<sub>2</sub> (M.W.=147)  
pH nastavujeme pomocí HCl  
100 µl alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20° C

### ***Hydrolyzační mix***

MN/SPD mix : Hydrolyzační pufr = 4 : 1  
Připravujeme **vždy čerstvý** před hydrolýzou DNA vzorků v množství potřebném pro experiment.

### **Potřebné přístroje**

centrifuga Savant HSC 10K  
vortex MS1, Schoeller Pharma  
termobloky na ependorfky, Liebisch

### **Podmínky hydrolýzy DNA**

Množství DNA na jeden vzorek:	6 µg
Výsledná koncentrace DNA	v hydrolyzační směsi: 0.4 µg/µl
MN ve vzorku:	0.3 U
SPD ve vzorku:	12 mU
pH	6.0
Celkový objem vzorku:	15 µl
Doba inkubace:	4 h
Teplota:	37°C

### **Postup hydrolýzy DNA**

**Pozor:** V každém pipetovacím kroku používáme vždy pro každý vzorek nových špiček, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorků. To platí i pro všechny následující postupy.

1. Objem. množství vzorku odpovídající 6.0 µg DNA napipetujeme do ependorfeček a 1.5 ml a doplníme redestilovanou vodou na celkový objem 7.5 µl (jsou-li vzorky DNA příliš zředěné, nutno předem odpařit a odparek rozpustit v 7.5 µl HPLC vody).
2. Připravíme potřebné množství MN/SPD mixu. Ke vzorkům napipetujeme a 7.5 µl takto připraveného enzymového mixu. Vzorky promícháme a krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 20 sec).
3. Ependorfky se vzorky umístíme do termobloku s teplotou nastavenou na 37°C a necháme 4 h inkubovat.

- Po skončené inkubaci vzorky krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 20 sec). Z objemu 15  $\mu$ l každého vzorku odpipetujeme 2.5  $\mu$ l do nově označených ependorfeč. Tyto alikvóty slouží pro stanovení koncentrace nukleotidů (dC,dG,dT,dA) pomocí HPLC. Alikvóty zamrazíme v kapalném dusíku a uchovááme v mrazícím boxu při - 20° C až do HPLC analýzy.
- Zbývající objem 12.5  $\mu$ l = „DNA-digest“ (odpovídá cca. 5  $\mu$ g DNA) se dále podrobuje obohacovacím postupům uvedeným v následujících sekcích 6 a 7 (butanolová extrakce, nuclease P1). Obohacovací postupy se provádějí buď bezprostředně po skončené hydrolyze nebo lze tyto alikvóty (12.5  $\mu$ l na vzorek) zamrazit a uchovat do druhého dne v mrazícím boxu při - 20° C.

### **Butanolová extrakce obohacování DNA aduktů**

Tento postup slouží k separaci modifikovaných nukleotidů (aduktů) od nukleotidů intaktních, která není nikdy dokonalá, a proto bývá označována jako obohacování aduktů. K oddělení DNA aduktů se využívá jejich extrakce do butanolové fáze.

### **Chemikálie**

Butanol 99.8 %, HPLC grade (Sigma-Aldrich 27,067-9)

Ostatní Sigma (analytical grade)

### **Roztoky**

#### **100 mM ammonium formate (AF) pH = 3.5**

Připraví se ředěním 2.5 M ammonium formate (roztok D-2, kap.9).

150  $\mu$ l alikvóty uchovááme v mrazícím boxu při - 20° C

#### **10 mM tetrabutylammonium chloride (TBA)**

69.5 mg TBA (Sigma T-1013, M.W.= 277.9) se rozpustí v 25 ml HPLC vody

150  $\mu$ l alikvóty uchovááme v mrazícím boxu při - 20° C

#### **200 mM Tris pH=9.5**

605.5 mg Tris (M.W.=121.1) rozpustíme ve 20 ml HPLC vody, nastavíme pH pomocí 1 N HCl a doplníme objem na 25 ml

150  $\mu$ l alikvóty uchovááme v mrazícím boxu při - 20° C

### **Potřebné přístroje**

centrifuga Savant HSC 10K

vortex MS1, Schoeller Pharma

rotační vakuový odpařovač Savant, SC 110 (USA) nebo Jouan RC 10.22 (Francie)

třepačka s výměnnými nástavci IKA-VIBRAX VXR, typ VX 2 (Janke&Kundel, GmbH)

### **Podmínky butanolové extrakce**

množství hydrolyzátu DNA:	12.5 µl „DNA digest“
pH:	3.5
směs před extrakcí:	12.5 µl DNA digest
	10 µl AF
	10 µl TBA
	67.5 µl deionized water
celkový objem	100 µl

### **Postup butanolové extrakce**

1. Připravíme butanol čerstvě nasycený HPLC vodou smícháním objemů v poměru 1:1 a protřepáním a HPLC vodu sycenou butanolem (v poměru 9:1) pro zpětnou extrakci. Obojí připravíme v takovém objemovém množství, které potřebujeme pro daný set vzorků.
2. Připravíme mix AF/TBA/HPLC voda (5/5/27.5) v množství potřebném pro daný set vzorků. Ke každému vzorku (12.5 µl DNA digest) přidáme 87.5 µl tohoto mixu.
3. Ke každému vzorku přidáme 100 µl butanolu nasyceného vodou. Vzorky důkladně protřepeme ručně anebo na vortexu (minimálně 2 min) a zcentrifugujeme (5000 ot/min, 5 min).
4. Odebereme opatrně vrchní butanolovou fázi (min 75 µl) do čistých ependorfeč a použité žluté špičky (pro každý vzorek jedna) ponecháme v příslušných ependorfkách pro další odběr butanolové fáze.
5. Ke zbytku vodné fáze přidáme opět 100 µl butanolu nasyceného vodou a provedeme opakovanou extrakci (vortex 2 min, centrifugace jako 3).
6. Odebereme opatrně vrchní butanolovou fázi (min 105 µl) a přidáme k první odebrané butanolové fázi (celkový objem odebrané butanolové fáze je cca. 180 µl).
7. K butanolové fázi přidáme 180 µl vody nasycené butanolem.
8. Opakujeme zpětnou extrakci přidáním 180 µl vody nasycené butanolem (vortex 2 min, centrifugace jako 3).
9. Odebereme opatrně vrchní butanolovou fázi do ependorfeč, do kterých jsme předtím napipetovali 2 µl 200 mM Trisu. Vzorky dáme odpařit do rotační vakuové odparky.
10. Po odpaření vzorky rozpustíme v 10 µl deionizované vody, důkladně zortexujeme a krátce zcentrifugujeme. Pokud nebudeme provádět značení ještě týž den, vzorky ihned zamrazíme a uchováme v mrazícím boxu při - 80° C až do značení (nejdéle však 3 dny).

## **Nuclease p1 pro obohacování DNA aduktu**

Tento postup je jinou alternativou způsobu obohacování DNA aduktů, který využívá specifické enzymové aktivity nukleázy P1. Ta odštěpuje zbývající fosfát z nukleosid-3'-monofosfátu preferenčně u normálních nukleotidů. Vzniklé nukleosidy jsou pak špatným substrátem pro T4-polynukleotidkinázu, která přenáší radioaktivní fosfát z adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na nukleosid-3'-monofosfáty. Obohacovací postup volíme podle typu vzorků, u vzorků neznámého původu používáme obou postupů. Tento postup provádíme vždy bezprostředně před vlastním značením vzorků. Vzorky po inkubaci s nuclease P1 nikdy nezamrazujeme.

### **Chemikálie**

Nuclease P 1 (SIGMA N 8630, 1 mg balení)

Ostatní Sigma (analytical grade)

### **Roztoky**

#### ***0.64 M Na-acetate pH = 5.0***

2.178 g Na-acetate (M.W.=136.1) rozpustíme ve 20 ml a nastavíme pH pomocí zřed. kyseliny octové. Doplníme na objem 25 ml. 150  $\mu$ l alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20° C

#### ***3.2 mM ZnCl<sub>2</sub>***

10.9 mg ZnCl<sub>2</sub> (M.W.=136.3) rozpustíme v 25 ml HPLC vody.  
150  $\mu$ l alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20°C

#### ***1.36 M Tris pH = 9.5***

4.12 g Tris (M.W.=121.1) rozpustíme v 25 ml HPLC vody  
150  $\mu$ l alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20°C

#### ***10 mM Na acetate pH = 5.0***

Připravíme naředěním roztoku 0.64 M Na-acetate pH = 5.0  
(100  $\mu$ l roztoku + 6.3 ml HPLC vody)  
200  $\mu$ l alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20°C

### ***Nuclease P1***

1 mg rozpustíme v originální lahvičce ve 150  $\mu$ l HPLC vody a použijeme ihned k přípravě P1-mixu. Zbytek zamrazíme na -20°C  
Pro další použití může být uchovávána při -20° C nejdéle 4 týdny.

## Potřebné přístroje

centrifuga Savant HSC 10K  
vortex MS1, Schoeller Pharma  
termobloky na ependorfky, Liebisch

## Podmínky NUCLEASE P1

množství hydrolyzátu DNA:	12.5 $\mu$ l „DNA digest“
nuclease P1 na vzorek:	2.4 U
pH:	5.0
celkový objem vzorku při P1 postupu:	18.5 $\mu$ l
doba inkubace:	30 min
teplota při inkubaci:	37°C
ukončení reakce:	1 $\mu$ l 1.36 M Tris
celkový objem na konci procedury:	16.5 $\mu$ l

## Postup Nuclease P1

1. Připravíme P1-mix v množství potřebném pro daný set vzorků. Složení pro jeden vzorek:  
1  $\mu$ l nuclease P1  
1  $\mu$ l 0.64 M Na acetate, pH=5.0  
1  $\mu$ l 3.2 mM ZnCl<sub>2</sub>  
Ke každému vzorku (12.5  $\mu$ l DNA digest) přidáme 3  $\mu$ l P1-mixu jemně zamícháme na vortexu a krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 30 sec).
2. Vzorky inkubujeme v termobloku při 37°C po dobu 30 min.
3. Po skončené inkubaci krátce zcentrifugujeme (5000 ot/min, 30 sec) a ke každému vzorku přidáme 1  $\mu$ l 1.36 M Tris.
4. Vzorky dáme do lednice po dobu než můžeme zahájit značení v izotopové laboratoři nebo vzorky ihned zamrazíme a uchováme v mrazícím boxu při - 80° C až do značení (nejdéle však 3 dny).

## Značení DNA aduktů pomocí $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP

V této proceduře je radioaktivní fosfor přenesen ve formě fosfátu z  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (přítomen v molárním nadbytku) na 5'- hydroxylový konec modifikovaných nukleotidů působením T4-polynukleotidkinázy. Vzniká nukleosid-3',5'-bifosfát. **Provádí se v izotopové laboratoři při dodržování všech bezpečnostních předpisů platných pro práci s krátkodobými zdroji ionizujícího záření. 10). Objednávky, výdej, evidence a zacházení s odpady podléhají předpisům vydaným centrálním pracovištěm krčského areálu AV ČR.**

## Chemikálie

$\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP 3000 Ci/mmol; 1 mCi/100 $\mu$ l (Amersham, PB 10168)  
T4 Polynucleotide kinase (PNK) 30 U/ $\mu$ l (USB, #70031)  
Ostatní Sigma (analytical grade)

## Roztoky

### Značící pufr pH=9.0

230 mM Bicine  
115 mM Magnesium Chloride  
115 mM Dithiothreitol (DTT; D-0632)  
5.8 M Spermidine (S-2626)

*Pro přípravu 25 ml roztoku navážíme:*

0.9385 g Bicine (M.W.=163.2)  
0.274 g Mg Cl<sub>2</sub>  
0.443 g DTT (M.W.=154.2)  
0.2105 g Spermidine (M.W.=145.2)  
pH nastavujeme opatrně pomocí 1 N NaOH  
150  $\mu$ l alikvóty uchováváme v mrazícím boxu při - 20° C

## Potřebné přístroje

termobloky na ependorfky, Liebisch  
ochranné pomůcky pro práci v izotopové laboratoři

## Podmínky značení

množství DNA:	5 $\mu$ g
T4 PNK na vzorek:	3.6 U
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP na vzorek:	24.2 $\mu$ Ci
pH:	9.5
celkový objem během značení:	17.5 $\mu$ l (BUT); 24 $\mu$ l(P1)
doba inkubace:	30 min
teplota při inkubaci:	37°C

## Postup značení

1. Připravíme ATP-mix o objemu potřebném pro daný set vzorků. Pro jedno balení ATP o aktivitě 1 mCi (37 MBq) a objemu 100  $\mu$ l má ATP-mix následující složení:

Značící pufr	60 $\mu$ l
P N K	8 $\mu$ l
HPLC voda	142 $\mu$ l
<sup>32</sup> P-ATP	100 $\mu$ l

**Celkový objem 310  $\mu$ l (pro max. 40 vzorků)**

***NEVORTEXOVAT! jen opakovaně promíchat špičkou (cca 10 x).***

2. Ke každému vzorku (zkontroluj, jsou-li vzorky u dna ependorfky, jinak zcentrifuguj) přidáme 7.5  $\mu$ l ATP-mixu a opatrně promícháme špičkou. Vzorky dáme do termobloku a inkubuje 30 min při teplotě 37°C.
3. Po skončené inkubaci vzorky nanášíme na chromatografické folie, které umístíme do chromatografických tanků s roztokem D1, jak bude uvedeno v následující kapitole.

### **Tenkvrstvá chromatografie k separaci dna aduktu**

DNA adukty, označené  $^{32}\text{P}$  podle postupu uvedeném v předchozí kapitole, jsou v dalším postupu děleny vícerozměrnou tenkvrstvou chromatografií (TLC) s použitím polyethylenimin-celulosových folií. Chromatografie ve směrech D1, D2 a D5 se používá k odmytí nežádoucích radioaktivních komponent pro dosažení optimálního pozadí. Chromatografie D3 a D4 s mobilní fází o vysoké iontové síle, s kyselým (D3), resp. alkalickým (D4) pH, slouží k rozdělení aduktů s rozdílnou pohyblivostí za daných chromatografických podmínek.

### **Chemikálie a materiály**

chemikálie Sigma (analytical grade)

POLYGRAM CEL 300 PEI chromatografické fólie, 20x20 cm, 0.1 mm (Macherey-Nagel, Germany)

filtrační papír Whatman # 3

fluorescenční pero (Autoradiography pen Sigma Z36,351-0)

roentgenové filmy Kodak X-OMAT 35x43 cm a 20.3x25.4 cm (Sigma)

vývojka G153, ustalovač G354, Agfa

### **Roztoky**

#### ***D1: 1 M Sodium phosphate, pH = 6.8***

Příprava 2 l roztoku:

276 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (M.W.=138) nebo

240 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (M.W.=119.98) rozpustíme v 1.5 l HPLC  $\text{H}_2\text{O}$

Nastavíme pH pomocí konc. NaOH na 6.8 a doplníme objem na 2 l.

#### ***D2: 2.5 M Ammonium formate, pH = 3.5***

Příprava 500 ml roztoku:

50 ml formic acid (99%) smícháme s 300 ml HPLC  $\text{H}_2\text{O}$  a

cca. 20 - 30 ml 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (27%) až do pH = 3.5

Doplníme na objem 500 ml

**D3: 3.5 M LiF, 8.5 M Urea, pH = 3.5**

Příprava 2 l roztoku:

1020 g urea (M.W.=60.16) rozpustíme v 1,5 l HPLC H<sub>2</sub>O a přidáme

277.4 ml formic acid (99%)

Nastavíme pH pomocí LiOH na hodnotu 3.5

Doplníme objem na 2 l.

**D4-A: 0.5 M Tris, pH = 8.0**

Příprava 1 l roztoku:

60.55 g Tris (M.W.=121.1) rozpustíme v 900 ml HPLC vody

Nastavíme pH pomocí 1 N HCl a doplníme objem na 1 l

**D4: 0.8 M LiCl, 0.5 M Tris, 8.5 M Urea, pH = 8.0**

Příprava 2 l roztoku:

1020 g urea

121.1 g Tris (M.W.=121.1)

67.84 g LiCl (m.W.=42.4)

Rozpustíme v 1,5 l HPLC H<sub>2</sub>O

Nastavíme pH pomocí konc. HCl na hodnotu 8.0

Doplníme objem na 2 l.

D5 = D1: 1 M Sodium phosphate, pH = 6.8

**Potřebné přístroje**

chromatografické a promývací tanky

el. vysoušeče (vlasové)

prosvětlovací zařízení na fólie

hypercassette<sup>TM</sup> 35x 43 cm a 20.3x25.4 cm , Amersham, USA

automatický vyvolávač roentgenových filmů CURIX 60, Agfa

ochranné pomůcky pro práci v izotopové laboratoři

**Podmínky chromatografie**

Chromatografie D1 - D5 je schematicky zobrazena na obr.č.2.

D1 probíhá přes noc na konec filtrační pásky (10x20 cm, Whatman č.3) přisponkované k fólii, min. 15 h

D2 vyvíjení až k počátku (OR) s nanesenými adukty (cca 1 min)

D3 3.5 h

D4 3 h

D5 přes noc, až na konec filtrační pásky (10x7 cm, Whatman č.2) přisponkované k fólii, min. 15 h



## Postup chromatografie

1. Rozkreslení chromatografických fólií (obr.č.2) podle předlohy provádíme na prosvětlovacím zařízení, nejlépe před zahájením postlabelingového experimentu (před hydrolyzou). K rozkresleným a seříznutým fóliím přisponkujeme filtrační pásy 10x20 cm. Takto jsou folie připraveny pro nanášení vzorků.
2. Vzorky po označení  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP podle postupu uvedeném v kap. 8, kvantitativně nanášíme na vyznačený počátek OR a fólie ihned vložíme do chromatografických tanků s roztokem D1 (tank pro 16 vzorků - 180 ml D1). Necháme vyvíjet přes noc.
3. Ráno odstříhneme filtrační pásy podle vyznačené linie a fólie ponoříme s nosníkem do promývacího tanku s destilovanou vodou. Destilovanou vodu necháme mírně protékat tankem po dobu 20 min.
4. Po skončení promývání vyjmeme fólie s nosníkem a umístíme je pod vysoušeče. Sušíme opatrně s mírným ohřevem cca. 15-20 min. Suché fólie ponoříme do fotomisky s roztokem D2 a necháme vyvinout až po OR (trvá asi 1 min). Ihned vložíme do tanku s roztokem D3 (tank pro 16 vzorků - 180 ml D3) a vyvíjíme 3.5 h.
5. Po této době vyjmeme fólie z tanku, odstříhneme vrchní 2 cm pás fólie a rozstříhneme uprostřed podle vyznačených linií. Promyjeme (20 min) a vysušíme stejným způsobem jako po D1.
6. Suché fólie krátce ponoříme ve směru chromatografie D4 do roztoku D4-A ve fotomisce a ihned vložíme do chromatografického tanku s roztokem D4 (tank pro 16 vzorků - 180 ml D4) a vyvíjíme 3 h.
7. Po skončení fólie opět promyjeme (20 min) a vysušíme stejným způsobem jako v předchozím případě. K vysušeným fóliím přisponkujeme filtrační pásy 10x7 cm na koncovou stranu chromatografie D4, vložíme do tanku s roztokem D5 a necháme vyvíjet přes noc.
8. Následující den ráno odstříhneme filtrační pásy, fólie opět promyjeme a vysušíme. Každou fólii označíme číslem a v rozích 2 tečkami pomocí fluorescenčního pera. Umístíme do předem vyčištěných autoradiografických kazet. Ve fotokomoře vložíme filmy X-ray KODAK a necháme exponovat v mrazícím boxu při teplotě -80°C po dobu 1-5 dnů podle typu vzorků.
9. Filmy po skončené expozici vyvoláme v automatickém vyvolávací roentgenových filmů. Kontroluj stáří vývojky před vyvoláváním!

## Vyhodnocování chromatografických map DNA aduktu

Vyvolané roentgenové filmy představují mapu DNA aduktů, resp. spotů, na chromatografických fóliích pro jednotlivé analyzované vzorky. Pro daný set vzorků, resp. danou studii, se zvolí vhodný templát mapy spotů a diagonální radioaktivní zóny (DRZ) pro jejich vystříhování, který pak používáme pro všechny vzorky v dané studii. Aktivita vystřížených spotů a DRZ se měří na kapalném scintilačním počítači.

## **Chemikálie a materiály**

scintilační koktejl LSC SigmaFluoTM  
scintilační lahvičky (Alpha Dialab, 619 301)

## **Potřebné přístroje**

LS counter, Wallac (Pharmacia)  
ochranné pomůcky pro práci v izotopové laboratoři  
prosvětlovací zařízení  
dávkovač scint. koktejlu

## **Postup vyhodnocování chromatografických fólií**

1. Zvolíme vhodný templát mapy spotů a diagonální radioaktivní zóny (DRZ) pro jejich vystřihování. Tento templát pak používáme pro všechny vzorky v daném experimentu (studii). Templát rozkreslíme na filmech u všech jednotlivých vzorků včetně blankových vzorků (kap.2).
2. Podle filmu rozkreslíme templát na jednotlivé chromatografické fólie s použitím prosvětlovacího zařízení a vodících značek fluorescenčního pera. Jednotlivé spoty a DRZ u každého vzorku opatrně vystřiháme a vložíme do předem popsanych scintilačních lahviček. Do lahviček nadávkujeme scintilační koktejl (5 ml/lahvička), zazátkujeme a dáme měřit do scintilačního počítače. Používáme program „32-Postlabeling BB+JT“. Je vždy nutné provést v programu editaci referenčního data pro  $\gamma$ -32P-ATP použitého v daném experimentu. Ostatní parametry měření zůstávají zachovány.
3. Výsledky měření (CPM) jsou automaticky ukládány do file ve verzi LOTUS (WKS). Současně však necháme data tisknout v textové formě na připojené tiskárně pro kontrolu měření. Je-li měření v pořádku, příslušný file přeneseme disketou do počítače s programem EXCEL5, kde data vyhodnocujeme.

## **Stanovení celkové koncentrace nukleotidu pomocí HPLC**

Pro výpočet hladin DNA aduktů je nutné znát celkovou koncentraci nukleotidů v analyzovaných vzorcích. Analýza alikvótů jednotlivých vzorků, oddělených po hydrolýze DNA (kap.5) se provádí pomocí HPLC.

## **Chemikálie a materiály**

Standardy nukleotidů:

dG- 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphate, sodium salt, Sigma D 4147 (2 mg)

dA- 2'-deoxyadenosine 3'-monophosphate, sodium salt, Sigma D 3139 (1 mg)

dC- 2'-deoxycytidine 3'-monophosphate, sodium salt, Sigma D 3389 (1 mg)

dT- thymidine 3'-monophosphate, sodium salt, Sigma T 3512 (5 mg)

Acetonitril, HPLC grade

membránové filtry pro mobilní fázi, Waters  
chromatografická kolona SGX C18 5,4 x 250 mm, TESSEK, č.141 300013 001  
předkolona SGX C18 5,4 x 40 mm, TESSEK, ČR

### **Roztoky**

#### ***25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=4.0 s obsahem acetonitrilu 2% - mobilní fáze***

Pro přípravu 2 l roztoku rozpustíme v 1.5 l HPLC vody:

6.0 g bezvodý NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (M.W.= 120) nebo

6.9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (M.W.= 138)

Nastavíme pH pomocí zředěné kyseliny fosforečné. Přidáme 40 ml acetonitrilu a doplníme do 2 l. Před použitím vždy zfiltrujeme na filtračním zařízení Waters s použitím membránového filtru pro vodné mobilní fáze.

Uchováváme v lednici nejvýše do jednoho měsíce.

#### ***Roztoky standardů pro kalibraci o koncentraci 100 ng dC, dG, dT a dA/ěl –***

Nukleotidy rozpustíme (v originálních lahvičkách) v příslušném objemu HPLC vody, odpovídající koncentraci 1 mg/μl. Naředíme 10x na koncentraci 100 ng/μl. Alikvóty a' 100 μl uchováváme v mrazícím boxu při -80°C.

### **Potřebné přístroje**

centrifuga Savant HSC 10K

vortex MS1, Schoeller Pharma

filtrační zařízení pro mobilní fázi, Waters

HPLC systém Waters sestávající z následujících částí:

HPLC pumpa typ 600

diode-array detektor typ 966

autosampler typ 717

osobní počítač Digital

chromatografický software Millennium

laserová tiskárna HP 5P

### **Podmínky HPLC analýzy**

izokratické

mobilní fáze: 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s obsahem acetonitrilu 2%,  
pH=4.0

průtoková rychlost: 1 ml/min

doba analýzy: 14 min (závisí na použité koloně)

nástřikový objem vzorku: 5 μl

kolona: analytická, 4 x 250 mm, 5μm, ODS 18

detekce:	snímání spektra v rozsahu vlnových délek 230 - 320 nm; procesorování při 260 nm
kalibrační křivky:	standarty dC, dG, dT a dA-5'-monophosphates kalibrace pro jednotlivé nukleotidy se provádí v rozsahu 10-30 ng.
retenční časy:	dC - 3.7 min; dG - 5.5 min; dT - 6.3 min; dA - 10.9 min.

### Postup HPLC analýzy

1. Kalibraci pro jednotlivé nukleotidy provádíme v rozsahu koncentrací 10 - 30 ng vždy při výměně nové kolony nebo předkolony. Ověřujeme jednobodově před každým novým setem vzorků. Smícháme zásobní (zamražené) roztoky standardů v poměru 1:1:1:1, což odpovídá výsledné koncentraci nukleotidů 25 ng/μl a naředíme 10x. Provedeme nástřik 4 μl = 10 ng každého nukleotidu.
2. Alikvóty DNA vzorků po hydrolýze (2.5 μl) rozmrazíme a přidáme 37.5μl HPLC vody. Zvortexujeme a zcentrifugujeme. Vzorky přepipetujeme k HPLC analýze do příslušných insertů.
3. Naprogramujeme analýzu příslušného setu vzorku v programu Millenium. Výsledky analýz jednotlivých vzorků jsou automaticky vypisovány a současně ukládány na hard disk. Data přehráváme na diskety pro jejich evidenci. Z výsledků o koncentraci jednotlivých nukleotidů vyhodnocujeme jejich sumací koncentraci DNA ve vzorku (μg DNA), která byla vzata do postlabelingového experimentu.

### Výpočet hladin DNA aduktu

Výpočet hladin DNA aduktů v analyzovaných vzorcích provádíme v programu EXCEL5. Výsledky měření aktivity jednotlivých spotů a DRZ (v CPM), které jsou automaticky ukládány LS počítačem do file ve verzi LOTUS (kap.10), přeneseme disketou do osobního počítače s programem EXCEL5, kde data vyhodnocujeme. Pro výsledný počet DNA aduktů - Z v daném vzorku platí vztah:

$$Z \text{ (DNA adukty/10}^8 \text{ nucleotidů)} = 0.00501 \times \frac{Y_{\text{CPM}}}{X_{\mu\text{gDNA}}}$$

Množství DNA ve vzorku X (μg DNA) vyhodnotíme z HPLC analýzy nukleotidů (kap.11). Provádíme korekci CPM analyzovaných vzorků podle CPM blankových vzorků, a to pro jednotlivé spoty (DNA adukty) i DRZ. Příklad výpočtu je uveden v příloze.

Vypočítáme hladinu DNA aduktů standardů, které používáme při každém postlabelingovém experimentu pro kontrolu všech postupů. Je-li průměrná hodnota z triplikátu odchýlena od hodnoty deklarované pro standard > 15%, pak kvantitativní výsledky experimentu nepovažujeme za relevantní a hodnotíme pouze výsledky kvalitativní (mapa aduktů a jejich zastoupení v jednotlivých analyzovaných vzorcích).

---

Tabulka velká obr.1

Obr. 2 - velký

## LABORATOŘ GENETICKÉ EKOTOXIKOLOGIE

Vedoucí: MUDr. Radim Šrám, DrSc.  
Zdravotní ústav se sídlem v Kolíně, pobočka Praha  
a  
Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha  
e-mail: [rossner@biomed.cas.cz](mailto:rossner@biomed.cas.cz)

### STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP

## **15. Stanovení exprese proteinů p21<sup>waf1</sup> a p53 metodou ELISA**

Vypracoval: Mgr. Pavel Rössner, Ph.D.



## **Obsah**

1. Princip metody
2. Referenční materiály
3. Chemikálie a roztoky
  3. 1. Chemikálie
  3. 2. Roztoky
4. Přístroje a zařízení
5. Příprava vzorků krevní plazmy
6. Stanovení obsahu proteinů v krevní plazmě
  6. 1. Stanovení proteinu p21<sup>WAF1</sup>
    6. 1. 1. Ředění standardu proteinu p21<sup>WAF1</sup>
    6. 1. 2. Detekce proteinu p21<sup>WAF1</sup>
  6. 2. Stanovení proteinu p53
    6. 2. 1. Ředění standardu proteinu p53
    6. 2. 2. Detekce proteinu p53
7. Stanovení hladiny proteinu p53 v lyzátech lymfocytů
  - 7.1. Izolace lymfocytů z plné krve
  - 7.2. Příprava lyzátů lymfocytů
  - 7.3. Stanovení obsahu celkových proteinů pomocí kitu Protein Assay Kit (Sigma P5656)
  - 7.4. Stanovení proteinu p53 v lyzátech lymfocytů Elisou
8. Vyhodnocení výsledků
9. Přílohy
  9. 1. Stanovení proteinu p21<sup>WAF1</sup> - kalibrační křivka
  9. 2. Stanovení proteinu p53 - kalibrační křivka

### **1. Princip metody**

Metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je vysoce citlivá metoda umožňující stanovit přítomnost analyzovaného proteinu ve vzorku a ve spojení s konstrukcí kalibrační křivky provést i jeho kvantifikaci.

Metoda je založena na specifické interakci monoklonální protilátky se stanovovaným proteinem ve vzorku, vazbě další (většinou polyklonální) protilátky konjugované s vhodným enzymem (např. křenovou peroxidasou) na komplex protein-monoklonální protilátka a detekci pomocí substrátu (např. tetrametyl benzidinu, TMB). Substrát je příslušným enzymem štěpen na barevný produkt, jehož absorbance je měřena pomocí spektrofotometru. Čím vyšší je změřená absorbance, tím vyšší je obsah analyzovaného proteinu ve vzorku.

Stanovení se provádí na mikrotitračních destičkách, přičemž pořadí vzorku a detekčních protilátek může být různé. "Sandwich ELISA" zahrnuje vazbu primární monoklonální protilátky proti sledovanému proteinu na destičku,

přidání analyzovaného vzorku a po promytí detekci pomocí sekundární protilátky konjugované s enzymem namířené opět proti studovanému proteinu. Při modifikaci metody zvané “Nepřímá ELISA” se na destičku nejprve pipetuje analyzovaný vzorek, následuje přidání primární monoklonální protilátky proti hledanému proteinu a detekce pomocí sekundární protilátky konjugované s enzymem, která je namířená proti primární protilátce.

## **2. Referenční materiály**

Jako pozitivní kontrola a současně jako vzorky pro konstrukci kalibrační křivky byly použity: protein p21, kat. č. sc-4078 WB, Santa Cruz Biotechnology, USA; protein p53, kat. č. sc-4246, Santa Cruz Biotechnology, USA.

## **3. Chemikálie a roztoky**

### **Chemikálie**

*všechny použité chemikálie byly v kvalitě p.a.*

	výrobce	kat. č.
BSA	Sigma	A-3803
Ficoll	Amersham	17-1440-03
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Aldrich	25,810-5
KCl	Sigma	P-4504
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	104873
myší sérum	Oncogene	NS03L
NaCl	Merck	106404
NaHCO <sub>3</sub>	Aldrich	22,348-4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma	S-0876
Nonidet P-40	Sigma	N-6507
TMB	Sigma	T-8665
Tris	Sigma	T-1503
Tween-20	Sigma	P-9416

### ***Protilátky a standardy***

anti-p21WAF1, WA-1 EXBIO 11-338-C100  
anti-mouse IgG, konjug. s křenovou peroxidasou  
Amersham NA 931  
anti-p53, BP53-12, primární EXBIO11-114  
anti-p53, BMG-1B1, sekundární Roche 83830622  
protein p21WAF1 Santa Cruz Biotechnology sc-4078 WB  
protein p53 Santa Cruz Biotechnology sc-4246

## a. Roztoky

### ***Coating solution (250 ml)***

NaHCO<sub>3</sub> 2,1 g

pH 8,2

Při uchovávání při 4°C mění roztok pH, proto je vhodné jej rozpipetovat po 2 ml a zmrazit při -20 °C.

### ***PBS (500 ml)***

NaCl 4,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,58 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 g

KCl 0,1 g

pH 7,0

*Skladovat při 4°C.*

### ***PBS/Tween (500 ml)***

Tween-20 0,25 ml

PBS 500 ml

*Skladovat při 4°C.*

### ***Blokovací pufr (5% BSA v PBS) (20 ml)***

BSA 1 g

PBS do 20 ml

*Skladovat při 4 °C, ne však déle než 1 týden.*

### ***Stop Solution***

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) 2,68 ml

H<sub>2</sub>O 97,32 ml

*Skladovat při pokojové teplotě.*

### ***Lyzační roztok (100 ml)***

Tris 0,24 g

NaCl 0,87 g

Nonidet P-40 1 ml

pH 8,0

*Po rozpuštění přidat: inhib. proteáz (Roche, kat č. 1 836 153) 1 tableta/10 ml.*

*Skladovat při -20 °C.*

## **4. Přístroje a zařízení**

chladnička (+4 °C)

mrazák (-70 °C)

automatické pipety jedno- a osmikanálové

pH-metr Beckman  
 magnetické míchadlo  
 chlazená centrifuga Jouan MR22  
 chlazená centrifuga Heraeus Megafuge 1.0R  
 spektrofotometr „Spectra Rainbow reader“ Tecan, pro jeho ovládání použit osobní počítač a program pro měření a vyhodnocování mikrotitračních destiček KIMW (autor D. Kittrich)

## 5. Příprava vzorků krevní plazmy

Stanovení se provádí v krevní plazmě, příp. v lyzátech lymfocytů (postup pro zpracování lymfocytů je popsán v bodě 7). Při zpracování krevní plazmy se krev centrifuguje na centrifuze Jouan MR22 10 minut, 3 000 ot./min, teplota 20°C. Po ukončení centrifugace je odebrána krevní plazma (horní fáze) po 250 - 500 µl (v závislosti na celkovém objemu krevní plazmy) do mikrozkušavek a zamražena při -70 °C.

Při práci s krví, nebo s krevní plazmou je nutno dodržovat zásady práce s infekčními materiály. Po ukončení práce se použité nástroje i pracovní plocha dezinfikují vhodnými prostředky.

## 6. Stanovení obsahu proteinů v krevní plazmě

### 6. 1. Stanovení obsahu proteinu p21<sup>WAF1</sup>

#### 6. 1. 1. Ředění standardu proteinu p21<sup>WAF1</sup>

Standard p21WAF1 (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-4078 WB) je nutno naředit; naředěné vzorky jsou dále použity pro konstrukci kalibrační křivky. Protein je dodáván v roztoku o koncentraci 100 ng/µl; po dodání je roztok rozdělen do mikrozkušavek po 4 µl a zmražen při -20°C. Je nutno se vyvarovat opakovanému rozmrazování a zmrazování roztoku.

získaná koncentrace	výchozí roztok (konc.)	Coating solution
10 ng/µl	4 µl (100 ng/µl)	36 µl
1 ng/µl	40 µl (10 ng/ml)	360 µl
100 ng/ml	100 µl (1 ng/µl)	900 µl
50 ng/ml	300 µl (100 ng/ml)	300 µl
25 ng/ml	300 µl (50 ng/ml)	300 µl
12,5 ng/ml	300 µl (25 ng/ml)	300 µl
6,25 ng/ml	300 µl (12,5 ng/ml)	300 µl
1,25 ng/ml	200 µl (6,25 ng/ml)	800 µl
0,625 ng/ml	300 µl (1,25 ng/ml)	300 µl
0,063 ng/ml	100 µl (0,625 ng/ml)	400 µl
0 ng/ml	-	300 µl

Pro konstrukci kalibrační křivky jsou použity roztoky proteinu p21<sup>WAF1</sup> o koncentraci 50 ng/ml a nižší.

### **6. 1. 2. Detekce proteinu p21<sup>WAF1</sup>**

1. Na mikrotitrační destičku firmy Nunc (NN Immuno Module, Maxisorp F8 lot, kat. č. 468 667) napipetovat po 100  $\mu$ l jednotlivých ředění standardu p21<sup>WAF1</sup>, resp. analyzovaných vzorků krevní plazmy; každý vzorek i standard je analyzován v duplikátech; na destičku pipetovat nejprve standard (počínaje nejvyšší koncentrací), pak vzorky plazmy; inkubovat destičku při 4°C, přes noc.
2. Následující den vzorky odstranit, destičku 1x promýt roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku, přidat po 200  $\mu$ l blokovacího pufru a inkubovat při pokojové teplotě 2 hodiny (alternativně při 4°C přes noc).
3. Odstranit blokovací pufr a destičku promýt 2x roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku. Napipetovat primární protilátku WA-1 ředěnou v blokovacím pufru, vždy 100  $\mu$ l roztoku/jamku; koncentrace primární protilátky 4  $\mu$ g/ml. Inkubovat při pokojové teplotě 2 hodiny.
4. Destičku 4x promýt roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku, napipetovat sekundární protilátku anti-mouse IgG konjugovanou s křenovou peroxidasou ředěnou v blokovacím pufru v poměru 1:500, vždy 100  $\mu$ l roztoku/jamku. Inkubovat při pokojové teplotě, 60 minut (alternativně 2 hodiny).
5. Promýt destičku 7x roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku, zbylý roztok důkladně odstranit poklepnutím destičky o buničinu, přidat substrát TMB, 100  $\mu$ l/jamku, inkubovat 30 minut při pokojové teplotě ve tmě.
6. Reakci zastavit přidáním Stop Solution, 100  $\mu$ l/jamku, změřit absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda=450$  nm (referenční filtr  $\lambda=540$  nm).

### **6. 2. Stanovení obsahu proteinu p53**

#### **6. 2. 1. Ředění standardu proteinu p53**

Protein p53 (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-4246) je nutno naředit; naředěné vzorky jsou dále použity pro konstrukci kalibrační křivky. Protein je dodáván v roztoku o koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l; po dodání je roztok uchován při -20°C; roztok obsahuje 50% glycerolu, je tedy při uvedené teplotě v tekutém stavu.

získaná koncentrace	výchozí roztok (konc.)	Blokovací pufr
100 ng/μl	2 μl (1 μg/μl)	18 μl
10 ng/μl	20 μl (100 ng/μl)	180 μl
1 ng/μl	200 μl (10 ng/ml)	1800 μl
100 ng/ml	100 μl (1 ng/μl)	900 μl
10 ng/ml	100 μl (100 ng/ml)	900 μl
5 ng/ml	300 μl (10 ng/ml)	300 μl
2,5 ng/ml	300 μl (5 ng/ml)	300 μl
1,25 ng/ml	300 μl (2,5 ng/ml)	300 μl
0,625 ng/ml	300 μl (1,25 ng/ml)	300 μl
0,313 ng/ml	300 μl (0,625 ng/ml)	300 μl
0,157 ng/ml	300 μl (0,313 ng/ml)	300 μl
0 ng/ml	-	300 μl

Pro konstrukci kalibrační křivky jsou použity roztoky proteinu p53 o koncentraci 10 ng/ml a nižší.

### 6. 2. 2. Detekce proteinu p53

1. Na mikrotitrační destičku firmy Nunc (NN Immuno Module, Maxisorp F8 lot, kat. č. 468 667) napipetovat primární protilátku anti-p53 (BP53-12) ředěnou v Coating solution, vždy 50 μl/jamku; koncentrace primární protilátky 4 μg/ml; při 4°C, přes noc.
2. Promýt destičku 2x roztokem PBS/Tween, 200 μl/jamku, přidat po 200 μl blokovacího pufru a inkubovat při pokojové teplotě 2 hodiny.
3. Odstranit blokovací pufr a destičku promýt 2x roztokem PBS/Tween, 200 μl/jamku; napipetovat po 100 μl jednotlivých ředění standardu p53, resp. analyzovaných vzorků krevní plazmy; každý vzorek i standard je analyzován v duplikátech; na destičku pipetovat nejprve standard (počínaje nejvyšší koncentrací), pak vzorky plazmy. Ke standardům i ke vzorkům plazmy je nutno před nanesením na destičku přidat myší sérum (Oncogene, NS03L) tak, aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku byla 1,5%. Inkubovat destičku při pokojové teplotě 2 hodiny.
4. Promýt destičku 4x roztokem PBS/Tween, 200 μl/jamku, napipetovat sekundární protilátku anti-p53 (BMG-1B1) konjugovanou s křenovou peroxidasou ředěnou v blokovacím pufru, koncentrace 200 mU/ml, vždy 100 μl/jamku. Inkubovat při pokojové teplotě 1 hodinu.
5. Promýt destičku 7x roztokem PBS/Tween, 200 μl/jamku, zbylý roztok důkladně odstranit poklepaním destičky o buničinu, přidat substrát TMB, 100 μl/jamku, inkubovat 30 minut při pokojové teplotě ve tmě.

6. Reakci zastavit přidáním Stop Solution, 100  $\mu$ l/jamku, změřit absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda=450$  nm (referenční filtr  $\lambda=540$  nm).

## 7. Stanovení hladiny proteinu p53 v lyzátech lymfocytů

### a. Izolace lymfocytů z plné krve

1. Krev (min. 2 ml) nanést na Ficoll (Amersham, kat. č. 17-1440-03) (objem krve a Ficollu by měl být přibližně stejný) a centrifugovat 30 minut, 1600 ot., 4°C, na centrifuze Heraeus Megafuge 1.0R, při zastavování rotor nebrzdit.
2. Do nové zkumavky odebrat lymfocyty, přidat 10 ml PBS (pH 7.0), jemně promíchat a centrifugovat 15 minut, 1400 ot., 4 °C.
3. Odsát supernatant a lymfocyty znovu promýt podle podmínek v bodě 2.
4. Odsát supernatant, lymfocyty zamrazit při -70 °C (příp. možno pokračovat v přípravě lyzátů bez předchozího zmrazení lymfocytů).

### b. Příprava lyzátů lymfocytů

1. Lymfocyty rozmrazit, přidat cca 100  $\mu$ l lyzačního roztoku (LB) (v závislosti na množství sedimentu), resuspendovat a inkubovat na ledu 30 minut.
2. Centrifugovat 10 minut, 8000 ot., 4 °C.
3. Odebrat supernatant, příp. rozdělit na menší alikvoty a zamrazit při -70 °C. Použít 4  $\mu$ l lyzátu pro stanovení obsahu celkových proteinů.

### c. Stanovení obsahu celkových proteinů pomocí kitu Protein Assay Kit (Sigma P5656)

1. Naředit v destilované vodě zásobní roztok BSA (konc. 50 mg/ml) 50x. Ze získaného roztoku připravit vzorky pro kalibrační křivku:

<b>Albumin (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>zás. roztok albuminu (50x naředěný) (<math>\mu</math>l)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (<math>\mu</math>l)</b>
<b>10</b>	<b>1</b>	<b>99</b>
<b>25</b>	<b>2,5</b>	<b>97,5</b>
<b>50</b>	<b>5</b>	<b>95</b>
<b>100</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
<b>150</b>	<b>15</b>	<b>85</b>
<b>200</b>	<b>20</b>	<b>80</b>

1. Připravit vzorky lyzátů: naředit 4  $\mu$ l lyzátu a 96  $\mu$ l destilované vody, jako blank použít 4  $\mu$ l LB + 96  $\mu$ l destilované vody.
2. Ke všem vzorkům přidat po 10  $\mu$ l roztoku DOC, promíchat, inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.

3. Ke vzorkům přidat po 10  $\mu$ l TCA, promíchat, centrifugovat při pokojové teplotě 10 minut, 7 000 ot.
4. Odsát supernatant, sediment resuspendovat ve 100  $\mu$ l Lowry Reagent a 100  $\mu$ l destilované vody. Důkladně promíchat a inkubovat 20 minut při pokojové teplotě.
5. Ke všem vzorkům postupně přidávat po 50  $\mu$ l Folin et al. Reagent, okamžitě po přidání činidla promíchat. Vzorky inkubovat 30 minut při pokojové teplotě.
6. Změřit absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm a vypočítat obsah proteinů ve vzorcích.

### **Stanovení proteinu p53 v lyzátech lymfocytů Elisou**

Jedná se o modifikaci metoda popsané v bodě 6.2.2. Ředění standardu p53 je provedeno podle popisu v bodě 6.2.1.

1. Na mikrotitrační destičku firmy Nunc (NN Immuno Module, Maxisorp F8 lot, kat. č. 468 667) napipetovat primární protilátku anti-p53 (BP53-12) ředěnou v Coating solution, vždy 50  $\mu$ l/jamku; koncentrace primární protilátky 4  $\mu$ g/ml; inkubovat při 4 °C, přes noc.
2. Promýt destičku 2x roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku, přidat po 200  $\mu$ l blokovacího pufru (5% BSA v PBS) a inkubovat při pokojové teplotě 2 hodiny.
3. Naředit standard p53 (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-4246) a lyzáty lymfocytů v blokovacím pufru (obsah celkových proteinů v lyzátech lymfocytů v jedné jamce musí být 50  $\mu$ g).
4. Odstranit blokovací pufr a destičku promýt 2x roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku; napipetovat po 100  $\mu$ l jednotlivých ředění standardu p53, resp. analyzovaných vzorků lyzátů lymfocytů; každý vzorek i standard je analyzován v duplikátech; na destičku pipetovat nejprve standard (počínaje nejvyšší koncentrací), pak lyzáty lymfocytů; inkubovat destičku při pokojové teplotě 3 hodiny.
5. Promýt destičku 4x roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku, napipetovat sekundární protilátku anti-p53 (BMG-1B1) konjugovanou s křenovou peroxidasou ředěnou v blokovacím pufru, koncentrace 200 mU/ml, vždy 100  $\mu$ l/jamku. Inkubovat při pokojové teplotě 1 hodinu.
6. Promýt destičku 7x roztokem PBS/Tween, 200  $\mu$ l/jamku, zbylý roztok důkladně odstranit poklepáním destičky o buničinu, přidat substrát TMB, 100  $\mu$ l/jamku, inkubovat 90 minut při pokojové teplotě ve tmě.
7. Reakci zastavit přidáním Stop Solution, 100  $\mu$ l/jamku, změřit absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda=450$  nm (referenční filtr  $\lambda=540$  nm) a s využitím kalibrační křivky spočítat obsah p53 ve vzorcích lyzátů lymfocytů.



## **8. Vyhodnocení výsledků**

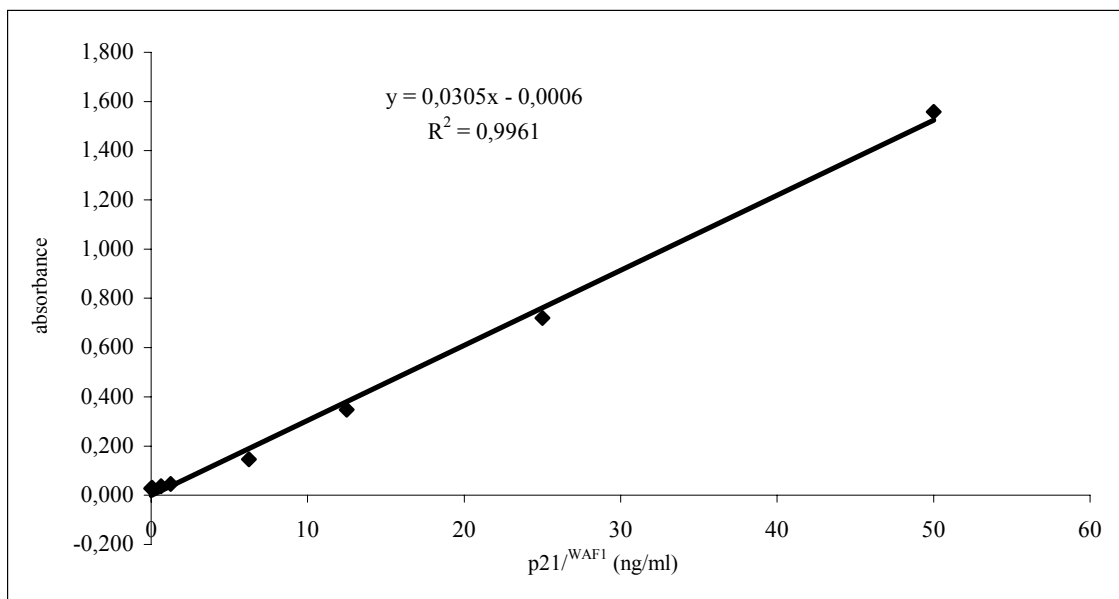
Po zastavení enzymatické reakce roztokem kyseliny sírové (Stop Solution) se vytvoří roztok žluté barvy; zbarvení je tím intenzivnější, čím je vyšší obsah proteinu p21<sup>WAF1</sup>, nebo p53 ve vzorku. Absorbance vzorků se měří pomocí spektrofotometru „Spectra Rainbow reader“ firmy Tecan, který je určen pro hodnocení mikrotitračních destiček. Nastavení přístroje i jeho ovládání je zajištěno pomocí osobního počítače připojeného ke spektrofotometru, a programu KIMW (autor D. Kittrich, dodavatel softwaru firma Schoeller Pharma Praha). Přístroj vypíše absorbance vzorků v jednotlivých jamkách na mikrotitrační destičce a na základě zadaných parametrů nakreslí kalibrační křivku, kterou proloží regresní přímkou, vypočte její rovnici a s jejím využitím i obsah proteinu p21<sup>WAF1</sup> a p53 ve vzorcích krevní plazmy. Výstup výsledků je zajištěn na jehličkovou tiskárnu.

Pro usnadnění archivace výsledků jsou získané hodnoty absorbancí exportovány do tabulkového editoru Microsoft Excell, v němž jsou zpracovány analogickým způsobem. Hodnoty absorbancí duplikátů jednotlivých vzorků jsou zprůměrovány, body tvořící kalibrační křivku jsou zaneseny do grafu, jimi je proložena regresní přímkou, vypočítána její rovnice a koeficient  $R^2$ , který udává přesnost výpočtu regresní přímky (čím více se jeho hodnota blíží „1“, tím je regresní přímkou přesnější). Na základě rovnice regresní přímky a s využitím hodnot průměru absorbancí vzorků je vypočten obsah proteinu p21<sup>WAF1</sup>, nebo p53 ve vzorcích. Obsah proteinů je v uveden v ng/ml krevní plazmy.

## 9. Přílohy

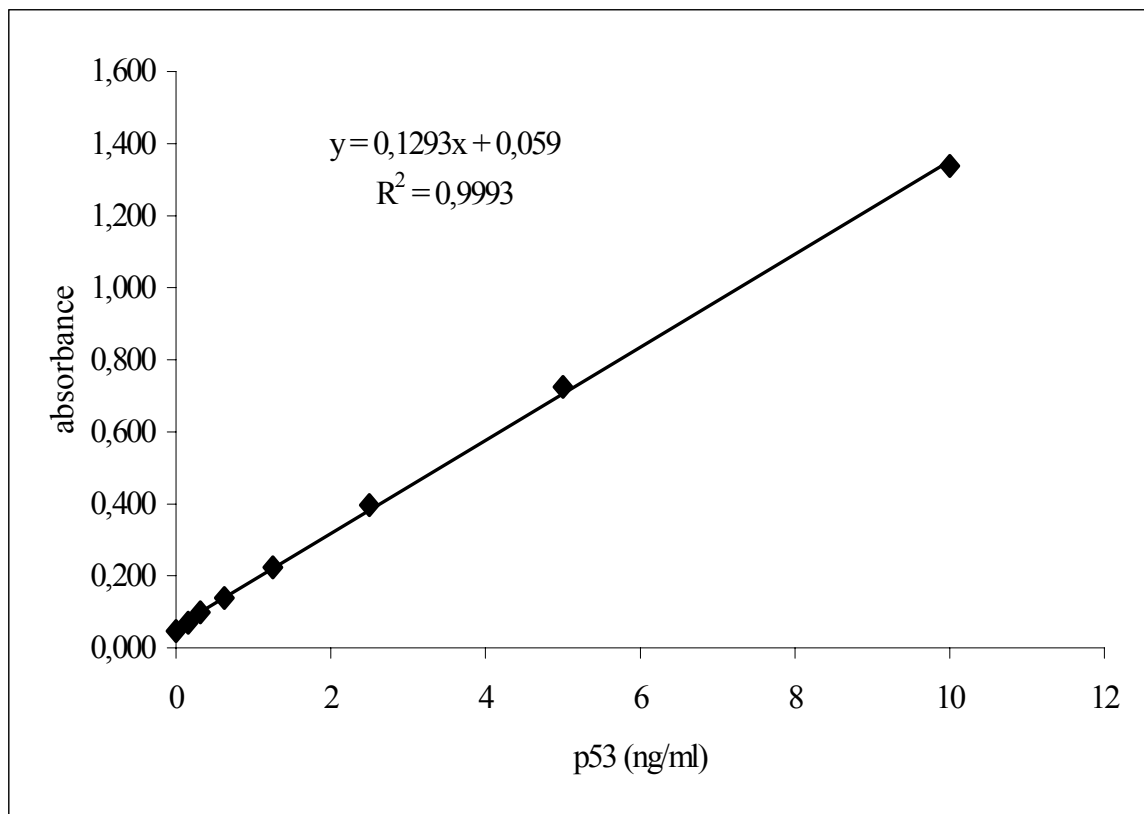
### 9. 1. Stanovení proteinu p21<sup>WAF1</sup> - kalibrační křivka

Příklad kalibrační křivky získané pomocí standardu p21<sup>WAF1</sup> (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-4078 WB); proložení regresní přímky; zpracováno v programu Microsoft Excell.



## 9. 2. Stanovení proteinu p53 - kalibrační křivka

Příklad kalibrační křivky získané pomocí standardu p53 (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-4246); zpracováno v programu Microsoft Excell.



## **LABORATOŘ GENETICKÉ EKOTOXIKOLOGIE**

Vedoucí: MUDr. Radim Šrám, DrSc.

Zdravotní ústav se sídlem v Kolíně, pobočka Praha

a

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

e-mail: sram@biomed.cas.cz

### **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

## **16. Měření koncentrace kotininu RIA metodou**

Vypracoval: Mgr. Alena Milcová

## **OBSAH**

1. Princip stanovení
2. Používané přístroje a vybavení
3. Odběr a uchovávání vzorků
4. Příprava vzorků
5. Použité chemikálie a roztoky
6. Příprava kalibračních standardů
7. Podrobný postup
8. Výpočet výsledků

### **1. Princip stanovení**

Ke stanovení koncentrace kotininu v moči nebo krevní plazmě se používá komerční radioimunologický kit, který je založen na kompetici mezi radioaktivně značeným a neznačeným kotininem při tvorbě vazby s omezeným množstvím specifických vazebných míst protilátky.

Při vlastním stanovení se ke standardu (vzorku) zředěného pufrům přidá kotinin značený tritiem a antikotininová protilátka. Po inkubaci se přidá králičí sérum a antikráličí imunoglobulin. Po inkubaci přes noc při 4°C se vzniklá sraženina odstředí a rozpustí v 0,1M NaOH. Po přidání scintilační kapaliny se měří aktivita komplexu kotinin-protilátka scintilačním počítačem. Pro každý analyzovaný set vzorků se proměřuje nová kalibrační křivka.

Ke stanovení nespecifické vazby se analyzuje vzorek obsahující normální králičí sérum místo antikotininové protilátky.

Přidaný pufr minimalizuje nespecifické vazby, vznikající v závislosti na pH a iontové síle vzorků moče nebo plazmy.

Koncentrace kotininu v plazmě se vyjadřuje v ng kotininu/ml plazmy. Pro stanovení kotininu v moči je nutné vypočítanou hodnotu koncentrace kotininu normovat na koncentraci kreatininu v témže vzorku. Hodnoty se pak vyjadřují v ng/mg kreatininu.

Za limitní hodnotu stanovené koncentrace uvedenou metodou se považuje nejnižší bod kalibrační křivky tj. 50 pg kotininu v 0,1ml vzorku.

### **2. Používané přístroje a vybavení**

4ml PE zkumavky s víčkem  
automatické pipety a dávkovače  
chladová místnost  
temperovaná vodní lázeň pro 37<sup>0</sup>C  
vortex MS1, Schoeller Pharma  
pH-metr, Beckman

chlazená centrifuga Jouan MR22  
scintilační počítač - LS counter, Wallac ( Pharmacia )  
dávkovač scintilačního koktejlu

### **3. Odběr a uchovávání vzorků**

#### ***Plazma***

Ihned po odběru se heparizovaná krev odstředí v chlazené centrifuze (1000g 10 min.). Potom se z vrchní části pipetou odebere plazma (minimálně 200  $\mu$ l).

#### ***Moč***

Pro stanovení koncentrace kotininu je nejvhodnější ranní moč (minimálně 200  $\mu$ l), protože poločas rozkladu kotininu je 19 hodin.

Ihned po odběru se vzorky plazmy nebo moče zamrazí při  $-20^{\circ}\text{C}$ . V případě, že se analýzy nebudou provádět do 1 týdne po odběru, skladují se při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4. Příprava vzorků**

Analyzované vzorky se po rozmrazení zvortexují a následně krátce odstředí. Pro vlastní stanovení se vzorky naředí v 1,5 ml ependorfkách podle dotazníkových dat o kouření:

#### ***vzorky moče:***

ředění <b>10x</b>	100 $\mu$ l vzorku + 900 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	všechny vz. - 0 cigaret/den
ředění <b>50x</b>	20 $\mu$ l vzorku + 980 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	1-2 cigarety/den
ředění <b>100x</b>	10 $\mu$ l vzorku + 990 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	3-5 cigaret/den
ředění <b>200x</b>	5 $\mu$ l vzorku + 995 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	5-7 cigaret/den
ředění <b>300x</b>	5 $\mu$ l vzorku + 1495 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	10 cigaret/den
ředění <b>400x</b>	5 $\mu$ l analytu + 1995 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	15 cigaret/den
ředění <b>500x</b>	5 $\mu$ l analytu + 2495 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	15 a více cigaret/den

#### ***vzorky krevní plazmy:***

ředění <b>10x</b>	100 $\mu$ l vzorku + 900 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	<10 cigaret/den
ředění <b>50x</b>	20 $\mu$ l vzorku + 980 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	>10 cigaret/den

Všechny vzorky se analyzují v duplikátech. Ideální počet vzorků je 30 - 38.

## **5. Použitá činidla a chemikálie**

***Isogel - Tris pufr*** - 250 ml:

(0,14M NaCl , 0,01M Tris-HCl, 0,1% želatina, pH=7,4)

2,03 g            NaCl  
0,305 g          Tris  
0,25 g            želatiny

Nejdříve rozpustit želatinu v destilované vodě. Pro rychlejší rozpouštění je vhodné roztok zahřívat (50°C). Přidat NaCl a Tris a upravit pH roztoku pomocí 6M HCl na hodnotu 7,4 a doplnit do 250 ml.

Uchovává se při 4°C a připravuje se čerstvý každý týden.

### ***0,1M NaOH***

400mg NaOH / 100 ml H<sub>2</sub>O

Rozpustit ve 100 ml destilované vody.

Skladuje se při laboratorní teplotě.

### ***Scintilační kapalina***

SIGMA-FLUOR - High Performance LSC Cocktail pro vodné roztoky Sigma S-4023

***Komerční kit*** (Brandeis University, Waltham, Massachusetts USA)

Uchovává se při -80°C.

Pro opakovaná stanovení se uchovávají rozpipetované alikvóty, které se před stanovením naředí podle šarže dodávaných kitů, pro nyní užívaný kit následujícím způsobem:

**<sup>3</sup>H Cotinine (1,1 x 10<sup>6</sup> cpm/ml)** zředit **20x**, tj.:

500 μl doplnit do **10 ml** Isogel-Tris pufr

**Normal Rabbit Serum (NRS) – neředěné** zředit **25x**, tj.:

400 μl doplnit do **10ml** Isogel-Tris pufr

**Normal Rabbit Serum - 10x naředěné** zředit **200x**, tj.:

10 μl + **2ml** Isogel-Tris pufru

**Ra.113 D-(14-23) Anti-Cotinin-CDI-Thyroglobulin - 10x zředěný**

zředit **200x**, tj.:

50 μl doplnit do **10ml** Isogel-Tris pufr

**Goat "Minnie" Anti-Rabbit-Gamma-globulins** zředit **4x**, tj.:

2,5 ml doplnit do **10ml** Isogel-Tris pufr

## **Cotinine STD 50 µg/ml - základní roztok**

500µl doplnit do 5ml Isogel-Tris pufrem a připravit kalibrační standardy

### **6. Příprava kalibračních standardů**

(Isogel-Tris pufr nechat vytemperovat při laboratorní teplotě)

roztok A:

**10µl Cotinine STD**- 50µg/ml (viz.kap.5 ) STD    výsl. konc. # pg/0,1 ml

roztok B:

**10µl** roztoku A + **5ml** Isogel-Tris pufru    ( 100ng/ml ) vzorku

roztok C:

**250µl** roztoku B + **250µl** Isogel-Tris pufru    (50ng/ml) **S7** 5000 pg

roztok D:

**200µl** roztoku C + **300µl** Isogel-Tris pufru    (20ng/ml) **S6** 2000 pg

roztok E:

**200µl** roztoku D + **200µl** Isogel-Tris pufru    (10ng/ml) **S5** 1000 pg

roztok F:

**50µl** roztoku C + **450µl** Isogel-Tris pufru    (5ng/ml) **S4** 500 pg

roztok G:

**200µl** roztoku F + **300µl** Isogel-Tris pufru    (2ng/ml) **S3** 200 pg

roztok H:

**200µl** roztoku G + **200µl** Isogel-Tris pufru    (1ng/ml) **S2** 100 pg

roztok I:

**50µl** roztoku F + **450µl** Isogel-Tris pufru    (0,5ng/ml)    **S1** 50 pg

### **7. Podrobný postup**

1. Připraví se duplikáty zkumavek (4ml s víčkem), které se označí T, NSB, B0, S1-S7 a dále čísla vzorků. Do všech zkumavek (kromě T) se napipetuje (dávkovačem) 500µl Isogel-Tris pufru.
2. Do zkumavky NSB a B0 se přidá 100µl Isogel-Tris pufru.  
Do zkumavek S1-S7 se napipetují připravené standardy kotininu (100µl).  
Do dalších zkumavek 1,2,3, se napipetují příslušně naředěné vzorky (100µl).
3. Do všech zkumavek se přidá 100µl zředěného 3H-Cotinine (10x). Zkumavku T uložíme do ledničky, protože už s ní nebudeme dále pracovat. Do



- zkumavky NSB se přidá 100 $\mu$ l zředěného (2000x) NRS a do ostatních zkumavek 100 $\mu$ l zředěného (2000x) Anti-Cotininu.
4. Všechny zkumavky se zvortexují a krátce odstředí a nechají se inkubovat ve vodní lázni při teplotě 37°C, 60min.
  5. Po ukončení inkubace se ke každé zkumavce přidá 100 $\mu$ l zředěného (25x) NRS a 100 $\mu$ l zředěného (4x) Goat“Minnie“Anti-Rabbit-Gamma-globulins. Všechny zkumavky se zvortexují a krátce odstředí a nechají se přes noc inkubovat při 40°C .  
Celkový objem v každé zkumavce (kromě T) je 1 ml.
  6. Následující den se všechny zkumavky (kromě T) zcentrifugují 45min., 3000g, 40°C. Vodní vývěvou se odsaje supernatant a sraženina se rozpustí ve 100 $\mu$ l 0,1M NaOH.
  7. Všechny zkumavky se zvortexují a krátce odstředí a přenesou se do radioizotopové laboratoře, kde se do všech zkumavek (i T) přidá 2,5 ml scintilační kapaliny, dobře se uzavřou, vloží do scintilačních lahvíček a změří se aktivita na scintilačním počítači.
  8. Pro měření se používá program LSC 06 Cotinine 3H - bez tisku. Výsledky jsou zaznamenávány na vloženou disketu a dále zpracovány v programu Excel.

**Likvidace vzniklého odpadu podléhá zvláštním předpisům pro radioizotopové laboratoře.**

### **8. Výpočet výsledků**

K výpočtu hodnot koncentrace kotininu ve vzorcích se používá počítačový program MICROSOFT EXCEL 97. Naměřené hodnoty cpm ze scintilačního počítače se přenesou do tabulky tohoto programu.

Pomocí funkce =LOGLINREGRESE(H11:22;G11:G22;PRAVDA;PRAVDA) a standardů S1-S6 se určí rovnice přímky  $y=B*M^{(B/BO)}$  (kde  $y$  = hledaná koncentrace sledovaného vzorku). V programu jsou vypočítány koeficienty M a B pomocí nichž je určena hodnota koncentrace kotininu v měřených vzorcích v ng/ml - sloupec I.

Pro každý vzorek je nutné doplnit hodnotu ředění – sloupec B. Při měření koncentrace ve vzorcích moče je nutno doplnit hodnotu kreatininu v mg/l – sloupec J a výsledná koncentrace kotininu je pak uváděna jako poměr koncentrace kotininu a kreatininu – sloupec K (ng kotininu /mg kreatininu).

Hodnota T (total) slouží ke kontrole celkového množství aktivity a měla by být přibližně rovna 15 000cpm.

Sloupec F (X-NSB) = hodnota naměřených cpm - hodnota nespecifické vazby NSB.

Sloupec G (B/BO) = hodnota X-NSB/BO x 100 = poměrné hodnoty B/BO v %.

## ***Omezení***

V případě, že interval rozdílu aktivit dvou stanovení téhož vzorku je větší než 20%, je nutné stanovení daného vzorku opakovat. Pro kalibrační standardy tento interval nesmí být větší než 10%.

Když je hodnota poměru B/BO u vzorku menší než hodnota poměru B/BO standardu S6 (2000pg/0,1ml), je nutné stanovení v další sadě opakovat s větším ředěním vzorku.

Když je hodnota poměru B/BO u vzorku větší než hodnota poměru B/BO standardu S3 (200pg/0,1ml) a bylo-li již provedeno ředění vzorku, je nutné stanovení v další sadě opakovat s nižším ředěním vzorku.

Z poměrů B/BO kalibračních standardů S1 - S6 (S7 se nezahrnuje) a odpovídajících koncentrací kotininu (50 - 2000 pg/0,1ml) můžeme sestavit graf v logaritmickém měřítku -  $\ln Y = m \cdot X + b$ , kde osa Y=ln koncentrace kotininu, osa X=poměr B/BO.

# **LABORATOŘ GENETICKÉ EKOTOXIKOLOGIE**

**Vedoucí: MUDr. Radim Šrám, DrSc.**

Zdravotní ústav se sídlem v Kolíně, pobočka Praha,

a

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

e-mail: sram@biomed.cas.cz

## **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

### **17. Stanovení vitamínů A a E v krevní plazmě**

**Vypracoval:** Ing. Zdenka Stávková

## **OBSAH**

1. Princip postupu
2. Chemikálie a rozpouštědla
3. Přístroje a zařízení
4. Požadavky na odběr a uchovávání vzorků
5. Příprava vzorků
6. HPLC analýza
7. Kalibrace postupu
8. Výpočet výsledků
9. Validace postupu
10. Seznam nebezpečných látek

### **1. Princip postupu**

Analytický postup využívá k separaci a kvantifikaci hladin vitaminů A a E v krevní plazmě nebo séru vysokoúčinné kapalinové chromatografie na kolonách s reverzní fází při isokratických podmínkách a metanolem jako mobilní fází.

### **2. Chemikálie a rozpouštědla**

#### **Rozpouštědla**

*n-heptan,metanol,ethanol* -gradient grade for chromatography, Merck, Germany

*Interní standard Vitamin A acetate* research grade (retinol acetate), Serva Feinbiochemica GmbH, Germany

*Etanolvý roztok vnitřního standardu retinol acetátu* o koncentraci v rozmezí 3-5 µg/ml. Připravujeme navážením přesného množství 3-5 mg standardu do eppendorfky, který rozpustíme v 1 ml etanolu (zásobní roztok). Z tohoto zásobního roztoku připravujeme srážecí etanolvý roztok s vnitřním standardem o výsledné koncentraci 3-5 µg/ml retinol acetátu (pipetujeme 100 µl do 100 ml etanolu). Srážecí etanolvý roztok vnitřního standardu připravujeme čerstvý před zpracováním vzorků a používáme nejdéle 1 týden. Jeho koncentraci a stabilitu stanovujeme na HPLC vždy před použitím daného roztoku.

#### **Externí standardy**

*Vitamin A alcohol* cryst. research grade, Serva Feinbiochemica GmbH, Germany

*DL-alpha-Tocopherol* research grade, Serva Feinbiochemica GmbH, Germany

### **3. Přístroje a zařízení**

laboratorní odstředivka typ Megafuge 1.0R Heraeus Instruments, Germany

laboratorní odstředivka typ Speedfuge HSC 10 K Savant, USA

Minishaker IKA, typ MS 1, Germany

vakuový rotační odpařovač (Savant, USA nebo Jouan, Francie)  
běžné laboratorní pipety a mikropipety  
skleněné kónické vialky, objem 1,1 ml  
septa PTFE / Silicone o průměru 8 mm

#### **HPLC zařízení:**

**HPLC- chromatograf firmy Beckman (USA) se softwarem System Gold Nouveau.**

Chromatograf se skládá z následujících částí:  
programovatelná pumpa 125 S Solvent Module  
programovatelný detektor Module 166 (detekce UV/VIS)  
system Gold 507e Autosampler  
osobní počítač

#### **4. Požadavky na odběr a uchování vzorků**

Odběr krve provádí školený zdravotní personál. Krev je odebrána v takovém množství, abychom po odstředění (cca 3000 otáček/min. po dobu 5 minut) získali cca 1 ml krevní plazmy - to znamená minimálně 2 ml krve. Krev je jímána do heparinizovaných zkumavek, takže po jejím odstředění získáme plazmu. Tuto plazmu uchováváme v mrazícím boxu nejlépe při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **5. Příprava vzorků**

Vitaminy A a E jsou na světle nestálé. Dochází k jejich postupnému rozkladu, což podmiňuje i následné zacházení se vzorky. ***Nikdy nenechávat v laboratoři na přímém světle.***

Plazmatické bílkoviny se vysráží etanolem s přidavkem vnitřního standardu pro kontrolu účinnosti následné extrakce, která je prováděna n-heptanem. Organický extrakt vzorku se zkoncentruje odpařením dosucha a znovu rozpuštěním v etanolu pro nástřik na chromatografickou kolonu.

#### **6. HPLC analýza**

##### **Chromatografické podmínky:**

Isokratické, s metanolem jako mobilní fází

Analytická kolona: SEPARON SGX C 18 (250x4,6 mm, 7  $\mu\text{m}$ ), Tessek, ČR

Detekce:

$\alpha$ -tocopherol	292 nm
retinol a retinol acetát	315 nm
Průtoková rychlost	1,0 ml/min.

**Retenční časy za výše uvedených podmínek:**

retinol	3,5 min.
retinol acetát	4,4 min.
$\alpha$ -tocopherol	6,8 min.

**Postup:**

Do eppendorfek objemu 2,2 ml napipetujeme 0,4 ml vzorku krevní plazmy. Přidáme 0,4 ml etanolového roztoku vnitřního standardu retinol acetátu o známé koncentraci (viz výše uvedené) a vzorek ihned krátce zvortexujeme (máme-li sadu např. 10 vzorků, zvortexujeme každý vzorek ihned po přidání, abychom minimalizovali sorbci vitaminů na sraženinu). Následně přidáme ke každému vzorku 0,4 ml n-heptanu k extrakci, intenzívně vortexujeme po dobu 1 minuty a odstředíme (cca 5 000 otáček za minutu po dobu 5 minut). Po odstředění odebereme z každého vzorku 350  $\mu$ l horní organické fáze (heptanové) do čistých skleněných vialek a odpaříme při normální teplotě do sucha ve vakuovém rotačním odpařovači. Odparek rozpustíme v 50  $\mu$ l ethanolu za intenzivního vortexování a vzorky následně krátce (1 minutu) zcentrifugujeme (kvůli separaci nerozpustných reziduí, která by mohla ucpávat kolonu). Vzorek je pak připraven k nástřiku na chromatografickou kolonu. Nástřik na kolonu ( 20  $\mu$ l ) provádí autosampler.

V této fázi přípravy vzorku dochází k 7násobnému zkoncentrování vzorku (z 350  $\mu$ l na 50  $\mu$ l). Toto je nutno vzít v úvahu pro výpočet koncentrace analytu.

**7. Kalibrace postupu**

Pro kvantitativní vyhodnocení hladin vitaminů A a E se provádí kalibrace používaného HPLC systému nástřikem přesně připravených roztoků standardů za využití softwaru firmy Beckman Instruments, Inc. Roztoky standardů pro kalibraci se připravují vždy čerstvé.

Kalibrace se provádí v tomto rozsahu koncentrací standardů:

Vitamin A (retinol)	0,25 $\mu$ g/ml - 10 $\mu$ g/ml
Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol)	2,5 $\mu$ g/ml - 200 $\mu$ g/ml
Retinol acetát (interní standard)	0,5 $\mu$ g/ml - 50 $\mu$ g/ml

Kalibrační křivky a jejich statistické vyhodnocení jsou uvedeny v příloze.

Závislost ploch píků na koncentraci v rozmezích výše uvedených je lineární.

Kalibraci je nutné provádět v celém rozsahu vždy po aplikaci nové kolony nebo jakékoliv změně chromatografických podmínek. V průběhu analýz pak stačí jednobodová kontrola kalibračních křivek.

## **8. Výpočet výsledků**

Koncentraci analytu vypočítáme pomocí software Gold Nouveau, který zintegrované plochy píků přepočítá na koncentrace podle zadané kalibrační křivky. Pokud dojde k posunu retenčních časů, je třeba tyto změny korigovat. Výsledky analýz jsou přepočteny na účinnost extrakce, která je stanovena pomocí vnitřního standardu retinol acetátu.

V příloze je uveden chromatogram analýzy lidské plazmy získané odstředěním heparinizované periferní krve (3000 otáček za minutu po dobu 5 minut při normální teplotě), softwarem vypočtená výška a plocha píků. Koncentrace vitamínu A a E v  $\mu\text{g/ml}$  je vypočtena na základě ploch příslušných píků a je vynásobena faktorem, který koriguje účinnost extraktu do heptanu.

## **9. Validace postupu**

### ***a) Specifičnost (Specificity)***

Metoda je *specifická* pro retinol i pro  $\alpha$ -tocopherol.

### ***b) Linearita (Linearity)***

Kalibrační křivka pro uvedený rozsah koncentrací je lineární.

### ***c) Mez detekce (Limit of detection LOD)***

Je stanovena opakovanou analýzou (10 krát) alikvotního podílu slepého pokusu. Je to taková koncentrace analytu, jehož odezva je ekvivalentní průměrné odezvě slepého pokusu plus trojnásobek odhadu směrodatné odchylky.

Vitamin A      LOD = 0,00944  $\mu\text{g/ml}$

Vitamin E      LOD = 0,01009  $\mu\text{g/ml}$

## Výpočty uvedených hodnot:

### Vitamin A

číslo měření	$x_i$ (μg/ml)	$(x_i - \bar{x}) \cdot 10^{-3}$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot 10^{-6}$
1	-0,0013	-1,11	1,23
2	-0,0006	-0,41	0,17
3	-0,0013	-1,11	1,23
4	0,0019	2,09	4,37
5	-0,0028	-2,61	6,81
6	-0,0010	-0,81	0,66
7	0,0026	2,79	7,78
8	-0,0009	-0,71	0,50
9	-0,0051	-4,91	24,11
10	0,0066	6,79	46,10

$$\Sigma = 92,96 \cdot 10^{-6}$$

$$\bar{x} = -0,00019 \text{ μg/ml}$$

$$\text{směrodatná odchylka sigma} = \frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

kde  $n = 10$

$$\text{sigma} = 3,21 \cdot 10^{-3} \text{ μg/ml}$$

$$3 \times \text{sigma} = 9,63 \cdot 10^{-3} \text{ μg/ml}$$

$$\text{LOD} = 9,44 \cdot 10^{-3} \text{ μg/ml}$$

### Vitamin E

číslo měření	$x_i$ (μg/ml)	$(x_i - \bar{x}) \cdot 10^{-3}$	$(x_i - \bar{x})^2 \cdot 10^{-6}$
1	0	1,19	1,42
2	0	1,19	1,42
3	0	1,19	1,42
4	0	1,19	1,42
5	0	1,19	1,42
6	0	1,19	1,42
7	-0,0119	-10,71	114,70
8	0	1,19	1,42
9	0	1,19	1,42
10	0	1,19	1,42



$$\Sigma = 127,48 \cdot 10^{-6}$$

$$x = -0,00119 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$n = 10$$

$$\text{směrodatná odchylka sigma: } 3,76 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g/ml} \quad 3 \times \text{sigma} = 11,28 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{LOD} = 1,009 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{g/ml}$$

#### d) Mez stanovitelnosti (Limit of quantitation LOQ)

Je nejnížší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelným stupněm správnosti a přesnosti. V případě HPLC metody stanovení hladin vitaminů A a E jsou to nejnížší body kalibračních křivek:

Vitamin A	LOQ = 0,25 $\mu\text{g/ml}$
Vitamin E	LOQ = 2,50 $\mu\text{g/ml}$
Retinol acetát	LOQ = 0,50 $\mu\text{g/ml}$

#### e) Správnost metody (Accuracy)

Lze ji ověřit analyzováním referenčního materiálu. Tuto analýzu provádíme formou kruhového testu, jehož se Laboratoř genetické ekotoxikologie účastní dvakrát ročně. Organizátorem a garantem kruhových testů je **INSTAND e.V.** (Institut pro standardizaci a dokumentaci v lékařské laboratoři) v Düsseldorfu, SRN. INSTAND Laboratoři genetické ekotoxikologie oznámí správné hodnoty koncentrací daného analytu spolu s vyhodnocením analýzy LGE (relativní chyba). Pokud laboratoř splní kritéria INSTANDU, obdrží certifikát platný pro stanovení daného analytu. Tento certifikát je k dispozici u pracovníka pověřeného stanovením vitaminu A a E. Uvedený certifikát platí po dobu jednoho roku.

#### f) Přesnost metody (Precision)

Je uvedena ve formě *varičního koeficientu VK (coefficient of variation nebo relative standard deviation)*:

$$VK = \frac{100}{x} \cdot \frac{\Sigma (x_i - x)^2}{n - 1} \quad n \geq 6$$

$x_i$	koncentrace analytu pro dané měření ( $\mu\text{g/ml}$ )
$x$	aritmetický průměr naměřených hodnot ( $\mu\text{g/ml}$ )
$n$	počet měření

V Příloze III je uvedena tabulka hodnot koncentrací vitamínu A a E pro výpočet variačního koeficientu. Variační koeficient byl vypočten z výsledků 10 vzájemně nezávislých analýz vitamínu A a E v lidské krevní plazmě.

VK pro vitamin A činí 8,2%, pro vitamin E 4,4%.

### **Opakovatelnost metody (Repeatability):**

Průběžně kontrolujeme analýzou poolového vzorku krevní plazmy.

### **10. Seznam nebezpečných látek**

Vitamin A alcohol je označen v katalogu firmy Serva jako látka středně jedovatá. Metanol je látka jedovatá a hořlavina.

## **VITAMIN A**

Tabulka hodnot pro výpočet variačního koeficientu VK

Č. měření	$x_i$ (μg/ml)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	0,9978	+0,1667	0,02778
2	0,8013	-0,0298	0,00088
3	0,8515	+0,0204	0,00041
4	0,7566	-0,0745	0,00555
5	0,7568	-0,0743	0,00552
6	0,8654	+0,0343	0,00117
7	0,8262	-0,0049	0,000024
8	0,8371	+0,0060	0,000036
9	0,8001	-0,0310	0,00096
10	0,8184	-0,0127	0,00016
			$\Sigma = 0,04249$

$$\bar{x} = 0,8311 \text{ μg/ml}$$

$$\text{VK} = 8,2 \%$$

## VITAMIN E

Tabulka hodnot pro výpočet variačního koeficientu VK

Č. měření	$x_i$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	10,2997	-0,4735	0,22420
2	10,2984	-0,4748	0,22543
3	11,5535	+0,7803	0,60886
4	10,4794	-0,2938	0,08631
5	10,2513	-0,5219	0,27238
6	11,2037	+0,4305	0,18533
7	10,7136	-0,0596	0,00355
8	11,4588	+0,6856	0,47005
9	10,7537	-0,0195	0,00038
10	10,7202	-0,0530	0,00281
			$\Sigma=2,0793$

$$\bar{x} = 10,7732 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{VK} = 4,4 \%$$

## **LABORATOŘ GENETICKÉ EKOTOXIKOLOGIE**

Vedoucí: MUDr. Radim Šrám, DrSc.

Zdravotní ústav se sídlem v Kolíně, pobočka Praha

a

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

e-mail: sram@biomed.cas.cz

### **STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP**

## **18. Stanovení vitamínu C v krevní plazmě**

Zpracoval: Ing. Zdenka Stávková

## **OBSAH**

1. Princip postupu
2. Chemikálie a rozpouštědla
3. Přístroje a zařízení
4. Požadavky na odběr a uchování vzorků
5. Příprava vzorků
6. HPLC analýza
7. Kalibrace
8. Validace postupu
9. Seznam nebezpečných látek

### **1. Princip postupu**

Analytický postup využívá k separaci a kvantifikaci vitamínu C (kyseliny askorbové) v krevní plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) na koloně s reverzní fází.

### **2. Chemikálie a rozpouštědla**

voda redestilovaná pro HPLC

dihydrofosforečnan draselný  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pro analýzi (Merck Germany)

kyselina metafosforečná  $(\text{HPO}_3)_n$  pro analýzi (Merck Germany)

standard pro kalibrační křivku: L - Ascorbic acid cryst. research grade,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , Boehringer Ingelheim (Germany)

### **3. Přístroje a zařízení**

laboratorní odstředivka typ Jouan MR 22 (Francie)

minishaker IKA, typ MS 1 (Germany)

přesné laboratorní pipety a mikropipety

kolona Tessek Separon SGX C 18 Steel 4 x 250 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$

membránové filtry Millex - HN, katalogové číslo SLHN RO4 NL, nylonová

membrána o velikosti pórů 0.45  $\mu\text{m}$

injekční stříkačky plastové

skleněné vialky 1.1 ml s kónickým dnem a se šroubovacími uzávěry z plastu

septa o průměru 8 mm, materiál silikon / PTFE

### **HPLC zařízení:**

HPLC - chromatograf firmy Beckman (USA) se softwarem System Gold Nouveau

chromatograf se skládá z následujících částí:

programovatelná pumpa Module 116, programovatelný detektor Module 166 (detekce UV / VIS), autosampler 507e

osobní počítač, tiskárna

#### **4. Požadavky na odběr a uchovávání vzorků**

Krev je odebírána do vacutainerů s heparinem, takže po jejím odstředění získáme plazmu. V čerstvé plazmě jsem neidentifikovala kyselinu dehydroaskorbovou, což je oxidovaná forma kyseliny askorbové.

Vzhledem k vysoké citlivosti vitamínu C na teplotu a oxidační činidla se snažíme omezit ztráty vitamínu C tím, že krev odstředíme v chlazené odstředivce a plazmu skladujeme v lednici. Následné ošetření plazmy pomocí kyseliny metafosforečné provedeme nejpozději do 2 hodin.

#### **5. Příprava vzorků**

0.4 ml krevní plazmy napipetujeme do plastových 4 ml zkumavek. Dále pipetujeme přesně 2 ml 6% kyseliny metafosforečné MPA, zkumavku uzavřeme víčkem a důkladně zvortexujeme. Přesnost pipetování je velmi důležitá, neboť dochází k ředění vzorku 6 x, což se dále promítá do výpočtu obsahu vitamínu C v plazmě. Kyselina metafosforečná srazí bílkoviny. Kyselé prostředí chrání kyseliny askorbovou před oxidací. Takto ošetřenou plazmu skladujeme v mrazícím boxu (- 20°C případně i nižší teplota) do dne měření na HPLC (nejdéle 1 týden).

#### **6. HPLC analýza**

*Chromatografické podmínky:*

Izokratický systém s mobilní fází dihydrofosforečnanem draselným

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3.7 mmol/l pH = 4.0

Analytická kolona: Tessek Separon SGX C 18, Steel 4 x 250 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$

průtoková rychlost 0.5 ml/min.

nástřik 20  $\mu\text{l}$

*Detekce:*

214 nm je absorpční maximum kyseliny dehydroaskorbové

245 nm je absorpční maximum kyseliny askorbové

Retenční čas za výše uvedených podmínek: cca 7 minut

#### **Pracovní postup:**

Zkumavky 4 ml, které obsahují 0.4 ml sražené plazmy a 2 ml MPA 6%, necháme šetrně rozmrazit. Tyto zkumavky odstředíme v odstředivce Jouan MR 22 (5000 rpm, 10 minut, 10°C). Poté odpipetujeme do plastových ependorfech s víčkem (2.2 ml) asi 1 ml supernatantu a znovu odstředíme, tentokrát při

vyšších otáčkách (15000 rpm, 5 minut, 10°C). Takto získaný supernatant se zfiltruje přes nylonový membránový filtr s velikostí pórů 0.45 µm (Millex HN). Filtr nasadíme na koncovku plastové injekční stříkačky. Vzorek takto převedeme do skleněné vialky. Vialky uzavřeme plastovým šroubovacím víčkem opatřeným septem (materiál silikon/PTFE) a vložíme do autosampleru chlazeného na 5°C, nástřik do smyčky je 20 µl vzorku. Vzorek je zředěný 6 x, proto naměřenou hodnotu vynásobíme 6.

## **7. Kalibrace**

Kalibrační křivku stanovíme pomocí softwaru System Gold Nouveau. Závislost ploch píků na koncentraci vitamínu C je v uvedeném rozsahu 2.5 µg/ ml až 50 µg/ ml lineární.

Standardní roztoky pro kalibrační křivku připravujeme vždy čerstvé. Kyselinu askorbovou rozpouštíme v 6% MPA. Kalibraci je nutno provádět v celém rozsahu vždy při použití nové kolony nebo při jakékoliv změně chromatografických podmínek. V průběhu analýzy pak stačí jednobodová kontrola kalibrační křivky. Kontrolní vzorky navažujeme vždy čerstvé !

## **8. Validace postupu**

### ***a) Specifičnost (Specificity)***

Metoda je specifická pro kyselinu askorbovou.

### ***b) Linearita (Linearity)***

Kalibrační křivka pro uvedený rozsah koncentrací je lineární.

### ***c) Mez detekce (Limit of detection LOD)***

Je stanovena opakovanou analýzou (10 x) alikvotního podílu slepého pokusu. Je to taková koncentrace analytu, jehož odezva je ekvivalentní průměrné odezvě slepého pokusu plus trojnásobek odhadu směrodatné odchylky.

Vzhledem k tomu, že jsem desetkrát naměřila nulovou hodnotu vitamínu C, hodnota LOD je nulová.

### ***d) Mez stanovitelnosti (Limit of quantitation LOQ)***

Je to nejnižší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelným stupněm správnosti a přesnosti. V případě HPLC stanovení vitamínu C je to nejnižší bod kalibrační křivky 2.5 µg/ml.

### ***e) Přesnost metody (Precision)***

Uvádí se jako *směrodatná odchylka sigma nebo variační koeficient VK (relative standard deviation nebo coefficient of variation)*.

**VK = sigma / x 100 (procenta)**

$$\text{sigma } \sigma = \frac{\sum (x_i - x)^2}{n - 1}$$

- $x_i$  koncentrace analytu pro dané měření ( $\mu\text{g/ml}$ )  
 $x$  aritmetický průměr naměřených hodnot ( $\mu\text{g/ml}$ )  
 $n$  počet měření

**Tabulka hodnot pro výpočet variačního koeficientu VK**

č. měření	$x_i$ $\mu\text{g/ml}$	$x_i - x$	$(x_i - x)^2$
1	21.8	0.1	0.01
2	22.1	0.4	0.16
3	22.4	0.7	0.49
4	23.3	1.6	2.56
5	22.9	1.2	1.44
6	22.1	0.4	0.16
7	21.3	-0.4	0.16
8	21.5	-0.2	0.04
9	20.9	-0.8	0.64
10	18.7	-3.0	9.00
	<b><math>x = 21.7 \pm 1.3</math></b>		<b><math>\Sigma 14.66</math></b>

**variační koeficient VK = 5.9 %**

**průměrná hodnota vitamínu C v plazmě je  $21.7 \mu\text{g/ml} \pm 1.3$**

***f) Výtěžnost (recovery) a reprodukovatelnost metody***

byla stanovena u poolového vzorku plazmy, ke kterému se přidal standardní přídavek kyseliny askorbové v množství  $21 \mu\text{g/ml}$  (asi 100 % stanoveného obsahu kyseliny askorbové).



Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

č. měření	$x_i$ μg/ml	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	42.2	1.67	2.7889
2	41.3	0.77	0.5929
3	40.8	0.27	0.0729
4	39.8	-0.73	0.5329
5	41.2	0.67	0.4489
6	40.6	0.07	0.0049
7	40.2	-0.33	0.1089
8	40.3	-0.23	0.0529
9	39.8	-0.73	0.5329
10	39.1	-1.43	2.0449
	<b><math>\bar{x} = 40.53 \mu\text{g/ml} \pm 0.9</math></b>		<b><math>\Sigma = 7.1810</math></b>

variační koeficient VK = 2.2 %

$\sigma = 0.9 \mu\text{g/ml}$

Výpočet výtěžnosti ( recovery ) :

n	A	B	C	recovery
10	$21.7 \pm 1.3$	21	$40.53 \pm 0.9$	<b>95 %</b>

n počet měření 10

A stanovená hladina kyseliny askorbové v plazmě (μg/ml)

B standardní přídavek kyseliny askorbové do plazmy (μg/ml)

C stanovená hladina kyseliny askorbové v plazmě s přídatkem (μg/ml)

## **9. Seznam nebezpečných látek**

Kyselina metafosforečná je označena jako látka korozivní.