

HELSINGIN YLIOPISTO - HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/osasto - Fakultet/Sektion Matemaattis-luonnontieteellinen		Laitos - Institution Biotieteiden laitos, perinnöllisyystieteen os.	
Tekijä - Författare Anna Kaisa Vääänen			
Työn nimi - Arbetets titel Amesin testi ja mutaatioiden molekulaarinen analysointi: 2,4,6-trinitrotolueenin mutaatiopespektri <i>Salmonella typhimuriumin hisD3052</i> -alleelissa			
Oppiaine - Läroämne Perinnöllisyystiede			
Työn laji - Arbetets art Pro gradu		Aika - Datum Marraskuu 1995	Sivumäärä - Sidoantal 72
Tiivistelmä - Referat <p>Genotoksisuutta mittaavista lyhytaikaisista testeistä tärkein on Amesin <i>Salmonella</i>/nisäkäsmikrosomitesti, joka perustuu histidiinin suhteen auktotrofisten <i>S. typhimurium</i>-bakteerien reversioon prototrofiseksi tutkittavan aineen vaikutuksesta. Vaikka Amesin testiä on käytetty pitkään, on siinä tapahtuvista DNA:n sekvenssitason muutoksista alkanut kertyä tarkkaa tietoa vasta viime vuosina. Molekyylitason tutkimukset ovat kuitenkin tärkeitä mutaatiomekanismien, mutageenisuuden ja niitä mahdollisesti seuraavan karsinogeenisuuden selvittämisessä.</p> <p>Amesin testissä käytetyimpiä ovat <i>hisD3052</i>-alleelin sisältävät <i>Salmonella</i>-kannat, joilla <i>hisD</i> fenotyyppi johtuu <i>hisD</i>-geenissä ennenaikaisen terminaation aiheuttavasta -1 deleetiosta ja jotka täten ovat erityisen herkkiä frameshift-mutageeneille. Monien aineiden mutageeniseen potentiaaliin vaikuttaa myös bakteerien entsyymiaktiivisuus: tätä varten on kehitetty YG-kantoja, jotka tuottavat kohonneita määriä nitroreduktaasia ja/tai O-asetyyli transferaasia.</p> <p>Nitroaromaattinen 2,4,6-trinitrotolueeni (TNT) on yleisesti käytetty räjähdysaine ja 1. lk:n myrkky, jonka mahdollista karsinogeenisuutta ei tunneta. Amesin testissä TNT on frameshift-mutageeni, kun nisäkäsperäistä metabolista aktivaatiosysteemiä ei käytetä. Kohonneet entsyymiaktiivisuudet lisäävät TNT:n mutageenisuutta.</p> <p>Tässä työssä analysoitiin TNT:n <i>hisD3052</i>-alleelissa indusoimia mutaatioita ja selvitettiin, vaikuttavatko TNT:n metaboliaan osallistuvien entsyymien erilaiset määrät mutaatioiden tyyppiin. Testit tehtiin kannoilla TA98, YG1021 (nitroreduktaasin ylituotto) ja YG1024 (O-asetyyli transferaasin ylituotto), jokaisesta kannasta analysoitiin 20 spontaania ja 20 TNT:n indusoimaa revertanttia. <i>HisD</i>-geenin tutkittava alue monistettiin asymmetrisellä PCR:llä, yksijuosteinen tuote puhdistettiin "kiinteä kantaja"-menetelmällä ja sekvenssoitiin.</p> <p>Amesin testissä saadut revertanttimäärät olivat YG-kannoilla huomattavasti korkeampia kuin TA98:lla. Kannasta riippuen 55-75% spontaaneista ja 80-95% TNT:n indusoimista mutaatioista oli hotspot-alueen -CG/GC-deleetioita: TNT, kuten useimmat aiemmin tutkitut mutageenitkin siis lisäsi näiden -2 deleetioiden määrää. Muut havaitut mutaatiot olivat pääosin kompleksisia eli yleensä sopivasta deleetiosta ja sen läheisestä emäsubstituutiosta muodostuvia reversioita. Tilastollisesti merkittävät erot havaittiin ainoastaan TA98:n spontaanin ja indusoidun mutaatiopespektrien välillä sekä TA98:n ja YG1024:n spontaanien spektrien välillä. Spontaaneissa spektreissä näytti kuitenkin esiintyvän useammanlaisia reversiotapahtumia kuin indusoiduissa. Entsyymiaktiivisuudella ei sen sijaan näyttänyt olevan vaikutusta ainakaan TNT:n indusoimiin spektreihin.</p>			
Avainsanat - Nyckelord Amesin testi, <i>hisD3052</i> , 2,4,6-trinitrotolueeni, mutaatiopespektri			
Säilytyspaikka - Förvaringställe Biotieteiden laitos, perinnöllisyystieteen osaston kirjasto			
Muita tietoja - Övriga uppgifter			