

Testování karcinogenních a mutagenních látek v našem okolí a stravě

Cílem je v teoretické rovině přiblížit studentům princip mutagenese a karcinogeneze a odlišení obou pojmů, aby bylo zřejmé, že každý karcinogen je mutagenem, ne u každého mutagenu však lze prokázat karcinogenní aktivitu. V praktické části mohou studenti provádět řadu jednoduchých testů, aby zjistili mutagenní charakter látek, které je obklopují. Testovacím modelem by mohla být *Drosophila melanogaster*, která je ideální genetickým modelem. Mutace jsou snadno rozeznatelné v binokulárním mikroskopu nebo pod silnou lupou. Pokusy se budou zaměřovat na možné chemické mutageny, které se mohou rozpustit v potravě muších larev, (zbytky vykouřených cigaret, podezřelé potraviny, čisticí prostředky, spáleniny jídel, plasty apod.). Studenti si během těchto pokusů osvojí jednoduchý chov nenáročného hmyzu a práci s binokulárním mikroskopem, případně pokud budou pokusy detailnější, i práci s klasickým mikroskopem (zkoumání mutací na povrchu křídla) a manipulaci s malými objekty.

Využité přístroje:

binokulární mikroskop, mikroskop

Cílová skupina/náročnost:

2. ročník SŠ a odpovídající ročníky gymnázií

Autor:

Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

Všechny uvedené texty, obrázky a videa jsou vlastní, není-li uvedeno jinak. Autory Youtube embed videí lze nalézt při kliknutí na znak Youtube ve videu během přehrávání.

K plnohodnotnému využití této studijní opory je nutný přístup k on-line zdrojům a materiálům.

Tento materiál vznikl z finanční podpory Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky v rámci projektu „Popularizace vědy a badatelsky orientované výuky“, reg .č. CZ.1.07/2.3.00/45.0007.

1 Základní informace o projektu

Cíle a cílové výstupy

Studenti by se měli seznámit s vlivem chemických mutagenů v prostředí, které je obklopuje, v teoretické části pochopit působení chemických mutagenů a také se seznámit s *Drosophilou melanogaster* jako genetickým modelem.

Studenti by měli po výuce ovládat principy a způsoby, kterými může být poškozena DNA a měli by znát praktické a zdravotní dopady, včetně ekonomických – získávání vhodných mutantů pro zemědělství. Hodnocení může být prováděno známkováním nebo slovním ohodnocením jejich pracovních protokolů na základě jejich srozumitelnosti, přínosnosti a opakovatelnosti pro případné další zájemce.

Cílová skupina

Cílovou skupinou by měli být studenti 1.-2. ročníku čtyřletého gymnázia nebo 5.-6. ročníku osmiletého gymnázia se zájmem o přírodní vědy, nicméně podobné pokusy lze provádět i na základních školách v rámci nepovinného předmětu i zájmových biologických kroužků, ale v tomto případě by se mělo jednat o zapálené jedince, a to kvůli nutné dávce trpělivosti a schopnosti manipulace s malými objekty.

Časová náročnost

Vzhledem ke generační době vývoje drozofil lze pokusy odhadnout na dvě vyučovací hodiny, každý sudý nebo lichý týden po dobu jednoho až dvou měsíců podle toho, kolik pokusů bude zvoleno a zda budou opakovány.

Pomůcky, přístroje a materiál

800 ml vody, 8 g agaru, 100g kukuřičné mouky, 75g cukru, 60g kvasnic, 10 ml kyseliny propionové nebo benzoové, vhodné skleničky nebo široké zkumavky, vaříč, dvě nádoby na přípravu, uzavíratelná nádoba na uskladnění živné půdy. Živé octomilky (drozofily), binokulární mikroskop, testované látky, případně zředěná kyselina chlorovodíková o pH 2, v případě provádění Wing spot testu - standardní mikroskop, dvě velmi ostré hodinářské pinzety, Faurův roztok (Faure's solutions) (30g arabské gumy, 30 ml glycerolu, 50 g chloralhydrátu, a 50 ml destilované vody) a velká dávka šikovnosti a trpělivosti.

Vše potřebné, jako mouchy, instantní krmivo a podobně, je rozněž možno objednat u firmy Carolina Biological (URL 12).

Úvod do tématu

Problematika vzniku mutací, případně rakoviny, je citlivým tématem, sdělovací prostředky čas od času referují o potenciálním nebezpečí mutagenů v našem okolí, bohužel nezřídka v panikařském duchu. Studenti si mohou sami kreativně vybrat a vyzkoušet, co budou testovat a jak citlivě. Při tom se naučí zvládat chov hmyzu a práci s binokulárním mikroskopem na vlastním projektu. Vytvoření vlastního projektu a jeho zpracování je více stimulující než úloha pouze zvolená učitelem. O problematice mutageneze existuje mnoho literatury, na úvod v češtině lze uvést některé stránky (URL 9, 10), nebo odborné vysokoškolské učebnice (Rosypal a kol. 1992, 2003, Alberts *akol.* 2014), pro jednoduchý chov drozofil můžeme vycházet např. z některé z akvaristických stránek (URL 6, 7). Jak vypadají mutace u drozofily, si lze najít na stránkách, kde jsou příslušné fotografie (URL 3, 4, 11), nebo v literatuře (Lindsley a Zimm 1992).

2 Popis aktivit

Podrobný popis aktivit

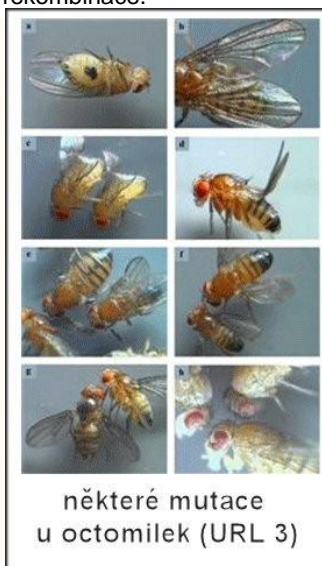
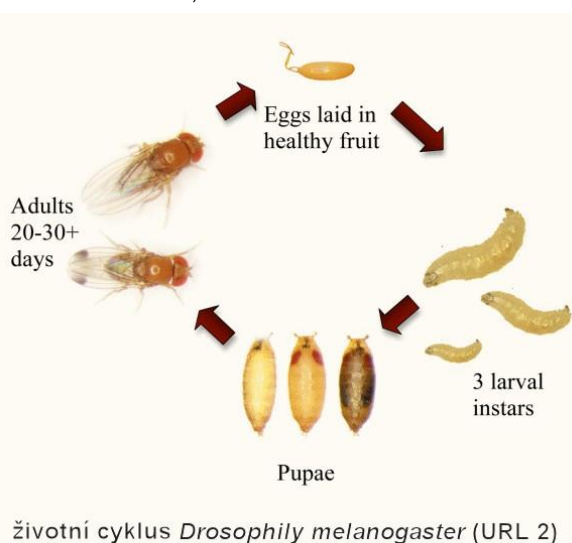
1) Opatříme si chov drozofil. První možnost je nacytat divokou formu z přírody. Nastrážíme ovoce někde v prostředí, kde se octomilky vyskytují, buď v mikroténovém sáčku, nebo ve sklenici, a jak se na ovoci shromáždí větší množství much, nástrahu uzavřeme a přeneseme je na připravenou živnou půdu. Využíváme toho, že se octomilky při vyrušení snaží vyletět vzhůru. Nebo si koupíme bezkřídlý chov, například od firmy Carolina (URL 5), ale tím se ochudíme o analýzu křídel, kde se dají dobře studovat somatické mutace (Graf 1984).

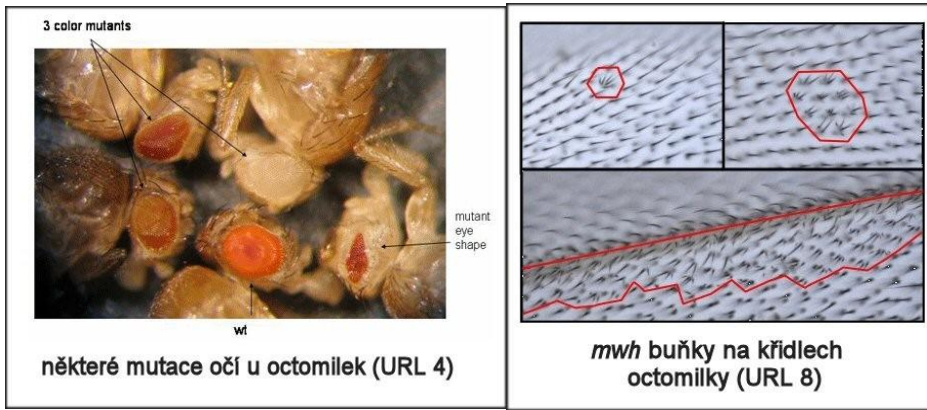
2) Vaření živné půdy. Na internetu lze najít řadu možností, jak připravit živnou půdu (např. URL 6, URL 7). Můžeme zvolit jeden z návodů. Připravíme si 500 ml vody, ve které necháme nabobtnat 8 g agaru. V jiné nádobě rozmícháme 200 ml vody a 100 g kukuřičné mouky a ve třetí nádobě si připravíme 100 ml roztoku z 2 dílů vody a 3 dílů cukru. Agar rozvaříme ve vodě a přidáme do něj nejdříve roztok vody a cukru a potom dohustíme vodou s kukuřičnou moukou. Směs dobře zamícháme, převaříme, aby neplesnivěla, a ještě horkou naléváme do připravených chovných sklenic. Pokud se nám sklenic nedostává, můžeme si připravený roztok uschovat do ledničky. Do chovných sklenic ještě nakapeme na povrch kvasnice rozetřené v troše vlažné vody. Přebytečnou vodu můžeme z chovných sklenic odsát např. pomocí filtračního papíru (viz URL 6). Ovšem proti nadměrnému přemnožení bakterií na povrchu nebo plesnivění je lepší ještě přidat před koncem vaření dezinfekci, např. cca 10 ml kyseliny propionové nebo benzoové, a řádně promíchat. Pro zásobní chov můžeme zvolit větší sklenici a pro pokusy nějaké menší nebo plastové silnější zkumavky. Hrdla je nutno uzavírat zátkami z molitanu nebo vatou.

3) Octomilky namnožíme a druhou generaci použijeme k pokusům. Připravíme vzorky, které chceme testovat, např. rozeleme a ve vodě vylouhujeme zbytky vykouřených cigaret nebo přepálený olej a podobně. Pokud chceme napodobit chemické reakce v lidském žaludku, můžeme vzorky namáčet v kyselině chlorovodíkové o pH 2. Do rozvařené živné půdy přidáme testovaný vzorek v tekuté fázi, zvolíme např. několik koncentrací, také testujeme několik vzorků. Nádobky (např. epruvety) s živnou půdou a vzorky necháme zchladnout (nejlépe přes noc nebo i kratší dobu, ale pak je nutno setřít ze stěn vysráženou vodu, aby se v ní mouchy neutopily). Na půdu vyklepeme několik drozofil (5-10), je nutné, aby byly přítomné samice, a necháme vyvinout další generaci. Chov raději umístíme v chladnějším prostředí cca 20-22 °Celsia, aby následující generace byla připravena za 14 dnů, ne zbytečně dříve. Na vývoj much se můžeme podívat na obr.1.

4) Po 14 dnech mouchy vyklepneme z epruvet a pozorujeme. Aby však neodletěly, je nutno je předtím uspat. Můžeme použít ether, ale po zkušenostech autora se studenty VŠ, kdy je místnost prosycena výparů etheru a u stropu létají mírně omámené octomilky, doporučuji použít led. Vyrobit kostky ledu na mrazáku, octomilky vyklepeme na led a pozorujeme je pod binokulárním mikroskopem. Pod led vložíme suchou utěrku, protože led pod teplem lampy rychle taje. Pokud máme možnost opatřit si levně tzv. suchý led, můžeme ji využít. Kultury před manipulací necháme chvíli v lednici, aby byly octomilky už od začátku málo pohyblivé. Případné mutace zaznamenáme. Pokud je na mikroskopu fotoaparát, nafotíme je (viz obr.2 a 3). Jestliže chceme zaznamenat mutagenitu látek opravdu citlivě, použijeme Wing spot test. Několik octomilek z kultury vybereme, humánně zabijeme a utrheme jim pomocí hodinářské pinzety křídla –pracujeme pod binokulárním mikroskopem. Pak přichází velmi obtížná část, malinké křídlo roztrhneme pomocí dvou hodinářských pinzet na hřbetní a břišní stranu a obě nalepíme na podložní sklíčko s kapkou Faurova roztoku. Můžeme ho zafixovat krycím sklíčkem, ale je lepší to nedělat. Následně preparát pozorujeme pod normálním mikroskopem při zvětšení 400x. Sledujeme výskyt mwh buněk a zaznamenáme jejich případný výskyt a porovnáme s kontrolou neovlivněnou potenciálními mutageny (Graf a kol. 1984, Frei a kol. 1992). Je třeba zvážit podle úrovně a zaměření studentů, jak precizně bude vypadat vyhodnocení pozorování.

Můžeme použít podklady z odborné literatury (Graf a kol. 1984, Frei a kol. 1992) nebo může učitel vytvořit nějaké jednoduché vlastní. Můžeme také použít pozitivní kontrolu s nějakým známým silným mutagenem, ale přípravu této kultury by měl z bezpečnostních důvodů provést jen učitel. U tohoto testu je nutno se také zaměřit na teoretickou část a vysvětlit somatické mutace, chromozomové aberace a mitotické rekombinace.





5) Možné pokračování – některé zajímavé mutanty můžeme dál chovat a zkusit vytvořit jejich čistou linii a zjistit, zda mutace je dominantní, nebo recesivní a zda je podmíněna jedním, nebo více geny.

3 Odkazy a literatura

Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. 2014 Molecular Biology of the Cell. 6th edition.. ISBN: 9780815344322

Frei H, Clements J, Howe D, Würgler FE. 1992 The genotoxicity of anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*; 279: 21-33

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984 Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*;271: 59-67

Lindsley D.L. Georgianna G. Zimm G.G. 1992 The Genome of *Drosophila melanogaster*. Publisher: Academic Press; 1 edition, 1133 pages, ISBN-13: 978-0124509900

Rosypal S. Úvod do molekulární biologie. 2.,rozš. vyd. Brno : Stanislav Rosypal, 1997.

Rosypal S. Úvod do molekulární biologie. 4.,rozš. vyd. Brno : Stanislav Rosypal, 2006

Internetové zdroje:

URL 1 - <http://www.rainforest.estranky.cz/clanky/chov-octomilek---krmiva.html>

URL 2 - <http://www.mountvernon.wsu.edu/entomology/pests/swd.html>

URL 3 - http://www.frontiersin.org/image/Modifications_in_progeny_Drosophila_melanogaster_containing_conditional_mutations/89

URL 4 - <http://faculty.mwsu.edu/biology/jon.scales/Courses/Genetics/Lab/lab.htm>

URL 5- <http://www.carolina.com/drosophila-fruit-fly-genetics/drosophila-vestigial-chromosome-2-mutant/172460.pr>

URL 6- http://www.akvarijni.cz/texty/chov_krmiva.htm

URL 7 -<http://www.rainforest.estranky.cz/clanky/chov-octomilek---krmiva.html>

URL 8 - <http://www.open.ac.uk/personalpages/r.d.saunders/>

URL 9 - <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>

URL 10 - <http://www.genetika-biologie.cz/mutageny>

URL 11 - http://www.exploratorium.edu/exhibits/mutant_flies/mutant_flies.html

URL 12 <http://www.carolina.com/life-science/genetics/drosophila-fruit-fly-genetics/10419.ct>

4 Projektový deník a otázky na přemýšlení

Vzor protokolu

František Octomilný

Datum: XXXXX

Gymnázium Pučmelounov

Téma:

Testování karcinogenních a mutagenních látek v našem okolí a stravě

Úvod:

Teorie a princip úlohy (*popsat velmi stručně nebezpečí mutagenů a jejich vliv na organismy a Drosophilu melanogaster jako genetický model. Rovněž stručně popsát důležitost testování látek, které jíme nebo s kterými přicházíme do kontaktu.*)

Materiál a pomůcky:

Seznam nutných věcí k provedení experimentu

Provedení:

1. Organismy, na kterých se pokus bude provádět. Jejich popis a způsob získání.
2. Popis chovu – příprava potravy, vytváření kontinuity chovu, množení a uchovávání hmyzích kultur (*popsat podrobněji*).
3. Vybavení laboratoře.
4. Popis testovaných látek, způsob jejich přípravy a dávkování do potravy hmyzu.
5. Pracovní postup: *Popis vlastní práce a vlastních modifikací, a zejména uvedení skutečně použitých poměrů testovaných látek a potravy hmyzu.*

Výsledky:

Uvedení přesného počtu mutací a jejich popis, pokud se nějaké podařilo objevit. Hodnoty je vhodné uvést do tabulky.

Diskuse:

V této části je nutno vyhodnotit získané výsledky a uvést předchozí práce, které se vztahují k tomuto tématu. Je možno vhodně využít hledání na internetu, např. Google Scholar. Vlastní výsledky je nutno popsát, zdůvodnit, proč k nim zřejmě došlo, a pokud možno porovnat s podobnými údaji, které už byly popsány, nebo je porovnat s výsledky dalších členů skupiny.

Závěr:

Krátce shrnout hlavní výsledky pokusu.

Sada otázek na přemýšlení

Proč dochází k mutacím a co se děje na DNA?

Jak se projevuje karcinogenní efekt?

Testovali jsme mutageny v potravě. Mohou mutace způsobovat i jiné vlivy?

Jsou také mutagenní pro člověka ty mutageny, které mohou ovlivnit mouchy?

Co by se stalo s námi vytvořenými mutanty v přírodě? Zkuste se zamyslet, zda některá konkrétní mutace by mohla být za nějakých podmínek výhodná. Příklad: na ostrově uprostřed oceánu bez predátorů je výhodné nemít křídla, protože létací hmyz zanese vítr nad vodu, kde se utopí.

5 Videa související s tématem

Mutace octomilek (angl.)

(video viz. on-line kurz)

Chov octomilek, většinou z instantních směsí (angl.)

(videa viz. on-line kurz)