

Ćwiczenie 18

Mutageny fizyczne i chemiczne. Wpływ promieniowania jonizującego na organizm. Wykorzystanie mutagenezy indukowanej.

Prof. dr hab. Roman Zieliński

1. Mutageny fizyczne i chemiczne

1.1. Pytania i zagadnienia

- 1.1.1. Wyjaśnij pojęcia: mutageneza indukowana, mutagen.
- 1.1.2. Jak dzielimy czynniki mutagenne?
- 1.1.3. Proszę podać krótką charakterystykę mutagenów fizycznych.
- 1.1.4. Proszę podać krótką charakterystykę mutagenów chemicznych?

1.2. Ćwiczenia

- 1.2.1. Wyobraź sobie, że musisz zmienić skład oleju rzepakowego tak aby zawierał więcej kwasów nienasyconych typu omega-3 (np., linolenowego, ALA). Obecna zawartość wynosi 2%. Synteza kwasów tłuszczowych jest szlakiem metabolicznym, gdzie na każdym etapie działa jeden enzym, przy czym geny wszystkich enzymów uczestniczących w szlaku zostały poznane. Wiadomo, że blokada przynajmniej jednego z enzymów doprowadzi do zmiany szlaku i gromadzenia się pożądanego kwasu linolenowego.
 - A. Jaki typ mutacji należałoby uzyskać aby zablokować jeden z enzymów szlaku?
 - B. Jaki typ mutagenu (fizyczny czy chemiczny) dałby największe prawdopodobieństwo uzyskania pożądanego mutacji?
 - C. Jaki typ mutagenu należałoby wybrać w sytuacji dostępu do przeciętnie wyposażonego laboratorium (dygestorium, pH-metr, dejonizator etc)?
 - D. Jaki typ mutagenu należałoby wybrać gdy nie mamy dostępu do laboratorium?

1.2.2. W tabeli poniżej podano nazwy mutagenów oraz grupy, do których mogą należeć. Proszę przyporządkować mutagen oznaczony cyfrą do grupy oznaczonej literą.

| Skrót | | Grupa | |
|--------|------------------|--------|--|
| Symbol | Nazwa mutagenu | Symbol | Nazwa grupy |
| 1 | Neutrony | A | Promieniowanie jonizujące, nie-korpuskularne, źródło aparat rentgena |
| 2 | Proflawina | B | Związki alkilujące |
| 3 | NaN ₃ | C | Promieniowanie jonizujące, korpuskularne |
| 4 | Gamma | D | Analogi zasad |
| 5 | MNU | E | Środki interkalujące |
| 6 | UV-B | F | Promieniowanie jonizujące, nie-korpuskularne, źródłem są izotopy ⁶⁰ Co, ¹³⁷ Cs |
| 7 | X | G | Inne związki chemiczne |
| 8 | 5-Bromouracyl | H | Promieniowanie niejonizujące |

1.3. Problemy

- 1.3.1. Wiele związków interkalujących jest wykorzystywanych do barwienia DNA, np. DAPI w mikroskopii fluorescencyjnej lub bromek etydyny w elektroforezie kwasów nukleinowych na żelach agarozowych. Zastanów się jaki jest mechanizm barwienia przy pomocy omawianych związków?
- 1.3.2. Azydek sodu jest związkiem toksycznym zwłaszcza po uwodnieniu. Pomimo tego jest on wykorzystywany w laboratoriach, w restauracjach jako środek dezynfekujący oraz w rolnictwie do zwalczania szkodników. Przykładowo, w 2010 r. doszło do zatrucia klientów jednej z restauracji w Dallas w Teksasie. Zastanów się w jakich sytuacjach możesz być narażony na działanie azydku sodu oraz jak zabezpieczyć się przed jego niekorzystnym wpływem?

2. Wpływ promieniowania jonizującego na organizm

2.1. Pytania i zagadnienia

- 2.1.1. Co to jest Siwert?
- 2.1.2. Czy organizmy żywe narażone są na naturalne promieniowanie? Jakie są ewentualne dawki takiego promieniowania? Skąd pochodzi promieniowanie naturalne?
- 2.1.2. Na podstawie efektów wybuchu reaktora atomowego w Czarnobylu omów wpływ promieniowania jonizującego na organizmy żywe?

2.2. Ćwiczenia

2.2.1. Wiedząc, że 98 nSv odpowiada 1 średniemu bananowi (1 BED) podaj jakiej ilości bananów odpowiadają dawki promieniowania podane w punktach A-C. Przyjmując, że 1 banana je się 2 minuty, podaj ilu minutom, godzinom i dniom odpowiadają poniższe dawki promieniowania.

- A: paczka papierosów: 986 nSv
- B: częste loty samolotem, 1.5 mSv rocznie
- C: 6 miesięcy na stacji kosmicznej: 80 mSv

2.2.2. Przyjmując, że roczna dawka promieniowania naturalnego na jakie jest ekspozycjonowany człowiek wynosi 3 mSv, podaj ilu miesiącom i dniom odpowiadają dawki podane w punktach A-C w zadaniu 2.2.1. Proszę przyjąć 1 miesiąc = 30.5 dni.

Samodzielne wykonanie ćwiczenia 2.2: 3 punkty (termin: 17.04.2019 r.)

2.3. Problemy

- 2.3.1. W wyniku wybuchu reaktora atomowego w elektrowni w Czarnobylu doszło do skażenia całej Europy. Proszę się zastanowić jakie były przyczyny skażenia tak znacznego obszaru?
- 2.3.2. Krótco po wybuchu w elektrowni w Czarnobylu w Europie wycofano z użytku masło i mleko i zalecano ograniczenie spożycia produktów mlecznych pochodzących z Europy przez okres co najmniej kilku miesięcy. Jaka była przyczyna tych zaleceń?
- 2.3.3. Po wybuchu w Czarnobylu powszechnie podawano do wypicia płyn Lugola. Jakie było uzasadnienie do tego działania?
- 2.3.4. Czy w świetle katastrofy w Czarnobylu uzasadnione jest dalsze korzystanie z elektrowni jądrowych? Proszę uwzględnić wnioski z Czarnobyla, działania międzynarodowych agencji w zakresie bezpieczeństwa jądrowego (IAEA) oraz awarie, które miały miejsce w ostatnich 10 latach (np. Fukushima).

Proszę przeprowadzić dyskusję w grupach.

3. Wykorzystanie mutageny indukowanej

3.1. Pytania i zagadnienia

- 3.1.1. Co oznaczają terminy M_0 , M_1 , M_2 ?
- 3.1.2. Co to jest chimera? Jakie znaczenie ma zjawisko powstawania chimer w mutageny indukowanej?
- 3.1.3. Jak definiujemy efekty somatyczne działania mutagenu? W którym pokoleniu obserwujemy efekty somatyczne? Wymień przykłady efektów somatycznych.
- 3.1.4. Jak sprawdzić efekty genetyczne działania mutagenu?
- 3.1.5. Z czym kojarzy się termin „zielona rewolucja”?

3.2. Ćwiczenia

- 3.3.1. Proszę wrócić do opisu ćwiczenia 1.2.1. Załóżmy, że wybrany typ mutagenu był mutagenem chemicznym. Proszę zaplanować doświadczenia mające na celu traktowanie mutagenem nasion rzepaku.

Nasiona traktuje się mutagenem poprzez 3-4 h moczenie nasion w roztworze mutagenu. Nasiona przed traktowaniem powinny być uwodnione poprzez 12 h moczenia w wodzie wodociągowej.

Traktowanie podwójne: nasiona traktuje się 3-4 h jedną dawką mutagenu (np. MNU), następnie płucze się i pozostawia 3-4 h w wilgotnych szalkach do wstępnego kiełkowania, następnie ponownie się traktuje drugą dawką lub kolejnym mutagenem (np. NaN_3).

Proszę uwzględnić następujące elementy.

- **A:** Jaki związek chemiczny użyjemy?
- **B:** Czy przeprowadzimy traktowanie pojedynczym mutagenem czy kombinacją dwóch związków?
- **C:** Jakie dawki mutagenu wybierzemy?
- **D:** Ile nasion należałoby potraktować? Czy powinniśmy założyć powtórzenia?
- **E:** Jak przeprowadzimy traktowanie? Wyobraź sobie poszczególne etapy.
- **F:** Co zrobimy z nasionami po traktowaniu?
- **G:** Jakie analizy przeprowadzimy w M_1 ?
- **H:** Jak należy zebrać nasiona z roślin M_1 ?
- **I:** Jakie analizy należy wykonać w M_2 ?
- **J:** Ile roślin należy przeanalizować w M_2 przy zakładanej częstości mutacji genów warunkujących syntezę kwasów tłuszczowych wynoszącej 0,003 (3×10^{-3})

3.3.2. Proszę wejść na stronę „Mutant Variety Database” prowadzoną przez IAEA (<https://mvd.iaea.org/#!Home>). Jeżeli adres nie uruchamia się bezpośrednio z pliku to proszę go wkopiować w przeglądarce w pasku adresów.

The screenshot shows the IAEA MVD website. The search bar contains the text "Enter search text". The search button is a green icon with a magnifying glass. The search results table is partially visible, showing columns for Variety Name and Latin Name.

| Variety Name | Latin Name |
|--------------|----------------------|
| 092 | Triticum aestivum L. |
| 113 | Gossypium sp. |

Proszę przejść do pozycji „Search” a następnie w pozycji „enter search text” wpisać „Pisum sativum”. Otrzymane wyniki wyszukiwania proszę pobrać w pliku Excel. Na podstawie informacji zawartych w bazie (pobranym pliku) proszę podać:

- **A:** Liczbę wszystkich odmian mutacyjnych grochu (*Pisum sativum*) zarejestrowanych w bazie.
- **B:** Ile odmian zarejestrowały poszczególne państwa. Proszę podać liczbę i procent odmian dla danego państwa. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie.
- **C:** Proszę podać liczbę i procent odmian otrzymanych w wyniku działania promieniowania gamma, X, mutagenów chemicznych (niektóre mutageny są w postaci skrótów, np. EI: ethylenimine), kombinacji mutagenów fizycznych i chemicznych, spontanicznych mutacji oraz inne w przypadku braku informacji o mutagenie lub informacji niepełnej. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie.
- **D:** Ile odmian otrzymano w wyniku bezpośredniego namnożenia mutantu (direct use of induced mutant), ile przez krzyżowanie (crossing), ile przez inne metody? Wartości proszę podać w procentach.

Samodzielne wykonanie ćwiczenia 3.3.2: 3 punkty (termin: 17.04.2019 r.)

3.3. Problemy

- 3.3.1. Hodowla mutacyjna rozwinęła się przy istotnym wsparciu połączonych sekcji FAO i IAEA (FAO/IAEA). Jak wyjaśnić udział Międzynarodowej Agencji Atomistyki (IAEA) w wspieraniu hodowli mutacyjnej?
- 3.3.2. Dlaczego „zielona rewolucja” przyczyniła się do wzrostu zysków z uprawy zbóż na świecie?
- 3.3.3. Czy mutageneza indukowana może mieć zastosowanie w dobie rozwoju genomiki i sekwencjonowania genomów?

Odpowiedzi

1. Mutageny fizyczne i chemiczne

1.2.

1.2.2.:

1C; 2E, 3G, 4F, 5B, 6H, 7A, 8D

2. Wpływ promieniowania

2.2.

2.2.1. Wiedząc, że 98 nSv odpowiada 1 średniemu bananowi (1 BED) podaj jakiej ilości bananów odpowiadają dawki promieniowania podane w punktach A-C. Przyjmując, że 1 banana je się 2 minuty, podaj ilu **minutom, godzinom i dniom** odpowiadają poniższe dawki promieniowania.

● A: paczka papierosów: 986 nSv

1 BED = 98 nSv

A = $986/98 = 10$ BED

$10 \times 2 \text{ min.} = 20 \text{ min.} = 1/3 \text{ h} = 1/72 \text{ dnia}$

A: 10 BED, 20 min. 1/3 h, 1/72 dnia

● B: częste loty samolotem, 1.5 mSv rocznie

1 BED = 98 nSv = $98 \times 10^{-6} \text{ mSv}$

B = 1,5 mSv zatem

$B = 1.5/(98 \times 10^{-6}) = 1.5/98 \times 10^6 = 0.015306 \times 10^6 = 15\,306 \text{ BED}$

$15\,306 \text{ BED} \times 2 \text{ min.} = 30\,612 \text{ min.} = 510 \text{ h} = 21,3 \text{ dnia}$

B: 15 306 BED, 30 612 min. = 510 h = 21,3 dnia

● C: 6 miesięcy na stacji kosmicznej: 80 mSv

1 BED = $98 \times 10^{-6} \text{ mSv}$

C = 80 mSv zatem

$C = 80/(98 \times 10^{-6}) = 80/98 \times 10^6 = 0.816327 \times 10^6 = 816\,327 \text{ BED}$

$816\,327 \times 2 \text{ min.} = 1\,632\,654 \text{ min.} = 27\,211 \text{ h} = 1\,134 \text{ dni} = 3,1 \text{ lat.}$

C = 816 327 BED, 1 632 654 min. = 27 211 h = 1 134 dni = 3,1 lat

2.2.2. Przyjmując, że roczna dawka promieniowania naturalnego na jakie jest ekspozycjonowany człowiek wynosi 3 mSv, podaj ilu **miesiącom i dniom** odpowiadają dawki podane w punktach A-C w zadaniu. Proszę przyjąć 1 miesiąc = 30.5 dni.

● $3 \text{ mSv} = 12 \text{ m=cy}$

$$986 \text{ nSv} = 986 \times 10^{-6} \text{ mSv} = A$$

$$A = 986 \times 10^{-6} \times 12/3 = 986 \times 4 \times 10^{-6} = 3944 \times 10^{-6} \text{ m=cy} = 0,003944 \text{ miesiąca} = 0,12 \text{ dnia} = 2,88 \text{ h}$$

$$\mathbf{A = 0,003944 \text{ miesiąca} = 0,12 \text{ dnia}}$$

● $B = 1.5 \text{ mSv}$

$$12 \text{ m=cy} = 3 \text{ mSv}$$

$$B = 12 \times 1,5 \text{ mSv}/3 = 6 \text{ miesięcy} = 183 \text{ dni}$$

$$\mathbf{B = 6 \text{ miesięcy} = 183 \text{ dni}}$$

● $C = 80 \text{ mSv}$

$$12 \text{ m=cy} = 3 \text{ mSv}$$

$$C = 12 \times 80/3 = 320 \text{ miesięcy} = 3 \text{ 123 } 200 \text{ dni}$$

$$\mathbf{C = 320 \text{ miesięcy} = 9 \text{ 760 \text{ dni}}}$$

2.3.

2.3.1. Niektórzy naukowcy uważają, że wzrost zachorowań na chorobę Hashimoto (przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy), zwłaszcza we wschodniej Polsce związany jest z chmurą radioaktywną po katastrofie w Czarnobylu. Przemawia za tym wzrost zachorowalności wśród kobiet do 40 lat oraz rozmieszczenie geograficzne.

2.3.3. Płyn Lugola to wodny roztwór jodu w jodku potasu. Ma on działanie bakteriobójcze. Stosowany jest także w leczeniu niektórych chorób tarczycy. W wyniku wybuchu w Czarnobylu do atmosfery przedostał się promieniotwórczy izotop jodu ^{131}J . Zadaniem płynu Lugola było wchłonięcie jodu i tym samym zapobieżenie wchłanianiu jodu radioaktywnego. Nadwyżki jodu miały powstrzymać wbudowywanie jodu radioaktywnego do hormonów tarczycy, tyroksyny i trójjodotyroniny w celu zapobieganiu rakowi tarczycy. Było to działanie pozytywne w świetle ówczesnych informacji. Przy blokadzie informacji ze strony ZSRR brano pod uwagę najbardziej pesymistyczny wariant czyli nawet wybuch bomby atomowej Obecnie uważa się, że podanie jodu było zbędne, gdyż skala skażenia i tym samym zagrożeń nie była aż tak duża. Zbędne podawanie płynu Lugola może zaburzyć pracę tarczycy.

3. Wykorzystanie mutagenyzy indukowanej

3.1.

3.3.2. Mutant Variety Database

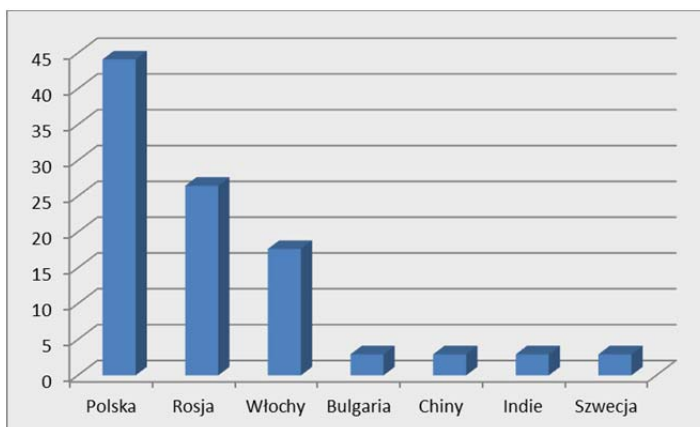
- **A:** Liczbę wszystkich odmian mutacyjnych grochu (*Pisum sativum*) zarejestrowanych w bazie.

A = 34 (0,2 p)

- **B:** Ile odmian zarejestrowały poszczególne państwa. Proszę podać liczbę i procent odmian dla danego państwa. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie. 1,2

B: 1,2 punktu po 0,4 za każdy element

| Państwo | Procent | Liczba |
|--------------|---------|-----------|
| Polska | 44 | 15 |
| Rosja | 26 | 9 |
| Włochy | 18 | 6 |
| Bulgaria | 3 | 1 |
| Chiny | 3 | 1 |
| Indie | 3 | 1 |
| Szwecja | 3 | 1 |
| razem | | 34 |

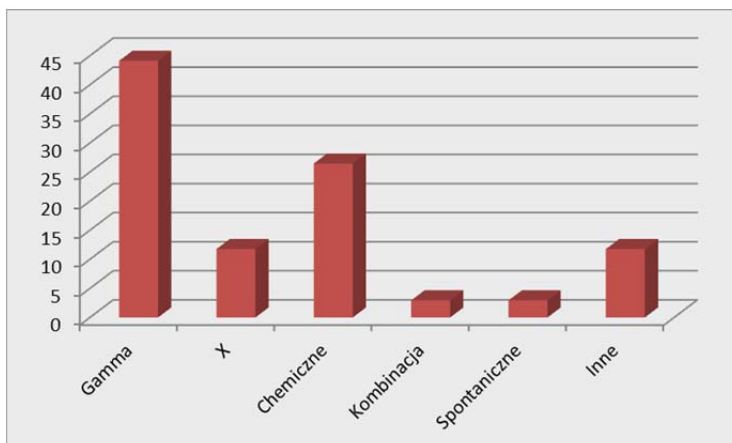


- **C:** Proszę liczbę i procent odmian otrzymanych w wyniku działania promieniowania jonizującego gamma, X, mutagenów chemicznych, kombinacji mutagenów fizycznych i chemicznych, spontanicznych mutacji oraz inne w przypadku braku informacji o mutagenie lub informacji niepełnej. Dane procentowe proszę przedstawić na wykresie.

C: 1,2 punktu, po 0,4 za każdy element

Niektóre mutageny są podane w postaci skrótów. Wszystkie są na wykładzie z wyjątkiem **EI: etylen: etylenimina**, Gamma i X: dwie wartości mogą być prawidłowe, gdyż w bazie jest niejasność.

| Mutagen | Procent | Liczba |
|--------------|---------|-----------|
| Gamma | 44 | 15 |
| X | 12 | 4 |
| Chemiczne | 26 | 9 |
| Kombinacja | 3 | 1 |
| Spontaniczne | 3 | 1 |
| Inne | 12 | 4 |
| Razem | | 34 |



- D: Ile odmian otrzymano w wyniku bezpośredniego namnożenia mutantu (direct use of induced mutant), ile przez krzyżowanie (crossing), ile przez inne metody? Wartości proszę podać w procentach.

D: 04 punktu, po 0,2 za każdy element

| | Liczba | Procent |
|--------------|---------------|----------------|
| Bezpośrednie | 15 | 44 |
| Krzyżowanie | 17 | 50 |
| Inne | 2 | 6 |