

- 1983。
[6] Allison, A.C. et al.: *Nature*, **210**: 259, 1966.
[7] 顾荣生等:《劳动卫生与环境医学》, **6**, 354, 1981。
[8] Stalder, K. et al.: *Nature*, **207**: 874, 1965.
[9] Inbar, M. et al.: *Europ. J. Cancer*, **13**, 1231, 1977.

- [10] 曹承敬:《国外医学卫生学分册》, **3**: 734, 1983。
[11] 程极济、林克椿主编:《生物物理学》, 320 页, 1981。人民教育出版社, 北京。

[本文于 1983 年 11 月 1 日收到]

羟磷灰石离心法及其在细胞 DNA 辐射损伤和修复研究中的应用

刘楠 郑秀龙

(第二军医大学, 上海)

Ahnström 等^[1]在 1973 年首先用羟磷灰石(以下简称 HA)层析法检测 DNA 单链断裂。该法较经典的硷性蔗糖梯度离心法操作简便, 灵敏度高。我们根据本室条件, 按照 Kanter 等^[2]的方法稍加改进, 用国产 HA 建立了 HA 离心分离检测 DNA 单链断裂及其重接的技术, 并用该法观察了小鼠白血病 L₇₁₂ 细胞 DNA 单链断裂及其重接。

材料与方法

(一) 细胞 取郑升等建立的小鼠腹水型淋巴性白血病细胞(L₇₁₂)^[3], 由 615 纯种小鼠(18—22g)腹腔接种传代。接种后 4—5 天将小鼠行颈椎脱臼处死, 抽取腹水。镜检 L₇₁₂ 细胞占有核细胞的 99% 以上。

(二) ³H-TdR 标记及细胞活力检测 将 L₇₁₂ 细胞悬浮于 RPMI 1640 培养液(含 20% 未灭活马血清)中稀释成 $1.5-2.5 \times 10^6$ 细胞/ml, 加入 ³H-TdR(比活 13—14 Ci/mmol, 0.5 μ Ci/ml), 37℃ 孵育 2—4 小时。离心后倾去放射性培养液, 用冰冷生理盐水洗涤离心后, 将细胞重新悬浮于新鲜非放射性培养液中, 于 37℃ 继续孵育 1—2 小时。在培养过程中取样用 0.2% 台酚蓝染色法检测, 5 分钟内未染色细胞为活细胞。

(三) 照射条件 细胞悬液置于 $\phi 1.5$ cm 玻璃试管内, 于冰水浴中距 ⁶⁰Co 源 40cm 处照射 5—40Gy, 剂量率 400 伦/分。

(四) 羟磷灰石离心法

1. 样品制备 照射后将细胞悬于冰冷生理盐水中, 取 0.2ml 细胞悬液(约 $4-8 \times 10^5$ 个细胞)放入平底塑料管内, 速加入 1ml 硷性溶胞液(0.03N NaOH, 0.01M Na₂HPO₄, 0.15M NaCl, pH > 12)于暗处 20℃ 静置 30 分钟, 使细胞溶破, DNA 解旋, 然后快速加入 0.034N HCl(含酚红作指示剂)1 ml 进行中和。立即将样品浸于冰水浴中, 用 CSF-1A 型超声波发生器(300 mA)超声处理 1 分钟, 使 DNA 被剪切成分子量为 4×10^5 dalton 以下的小片段^[4], 再加入 0.5% SDS 2ml, 使 DNA 和蛋白质解离, 混匀后冰箱内贮存备用。

2. DNA 单、双链分离 将上述制备好的样品加入装有 0.4—0.5g HA 的试管内。HA 预先用 0.01M 磷酸钾缓冲液(简称 KPB, pH 6.9)平衡 1 小时。用玻棒轻轻搅匀, 置 60℃ 水浴中保温 10 分钟, 间或搅拌二次, 使 DNA 吸附于 HA 上。室温下离心(3000rpm $\times$ 1min)后倾出上清液。

用 0.01M KPB 3ml (60℃) 洗涤 HA 沉淀, 除去游离 ³H-TdR、酚红等杂质。再用 0.125M KPB 3ml (60℃) 从 HA 上洗脱单链 DNA, 并离心收集上清液; 重复二次, 洗脱液合并收集。然后在 80℃ 用 0.25M KPB 3ml 洗脱双链 DNA, 离心收集上清液。重复二次, 洗脱液合并收集。

(五) 样品测量 标记细胞样品分离后的洗脱液各取 0.2ml, 加入 1N HCl 0.1ml 及水溶性

闪液 (PPO4g、POPOP 0.2g、二甲苯 650ml, 乙醇乙醚 350ml) 8ml, 混合后成透明均匀液, 在 TRI-CARB 460CD 液闪仪上计数。

纯化的天然或热变性小牛胸腺 DNA 按上述方法分离后, 各部分洗脱液用 SP8-100 紫外分光光度计测定 258 nm 处的光密度 (O. D.), 并作相应空白对照进行读数校正。

按公式(1)计算双链 DNA % (ds DNA %), 以此作为衡量 DNA 单链断裂的指标。

$$\text{dsDNA \%} = \frac{\langle 0.25M \text{ 洗脱液 cpm (或 O.D.)} \rangle / \langle 0.125M \text{ 洗脱液 cpm (或 O.D.)} \rangle + 0.25M \text{ 洗脱液 cpm (或 O.D.)}}{(1)}$$

做回收实验时, 分别取各部分洗脱液测量 O.D. (或计数), 将其总和与分离前样品 O.D. (或计数) 比较。

结 果

(一) HA 离心法分离小牛胸腺 DNA 单、双链

细胞在硷性环境中溶破, 释出的 DNA 发生链解旋。在一定的时间内, 解旋速度与 DNA 链断裂成正比。经中和及超声处理后, 解旋的和未解旋的 DNA 分别被剪切成单链或双链小片段。用 HA 离心法将单、双链 DNA 分离。从单链 DNA (或双链 DNA) 的多少可反映 DNA 链断裂的变化。因而 DNA 单、双链的分离是本法可靠性的重要环节。

为了观察 HA 离心法能否有效地分离 DNA 单、双链, 我们首先用纯化的天然或热变性小牛胸腺 DNA 进行分离。由图 1 可见, 天然 DNA (主要为双链) 在 0.25M KPB 出现洗脱峰, 而热变性 DNA (大部分成为单链) 在 0.125M KPB 就出现洗脱峰, 单、双链 DNA 洗脱峰分离度较好。样品与 HA 混悬后上清液中未被吸附的 DNA 低于 6%, 故吸附较完全。4 次实验结果表明天然的和热变性 DNA 洗脱后的回收率分别为 $94.0 \pm 3.9\%$ 和 $101.8 \pm 2.4\%*$ 。

(二) HA 离心法分离 L_{712} 细胞 DNA 单、双链

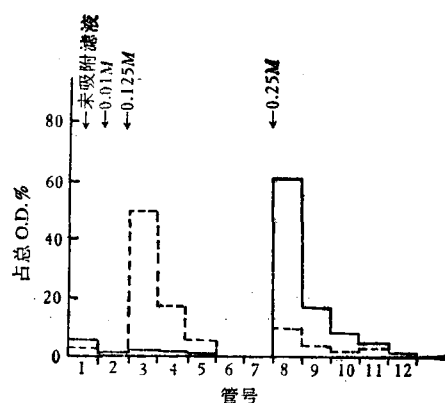


图 1 小牛胸腺 DNA 洗脱分布图
——天然 ---热变性

为确定细胞溶胞样品中所含蛋白质, 脂类等杂质是否对分离过程有影响, 我们观察了样品中 DNA 的洗脱分布情况。结果表明, 未照射细胞溶胞样品中 ^3H -TdR 标记的 DNA 大部分在 0.25M KPB 被洗脱 (图 2)。由 4 次实验结果得到 DNA 吸附率为 $99.4 \pm 0.21\%$, 回收率为 $90.4 \pm 1.56\%$ 。照射后, 经 0.125M KPB 洗脱的单链 DNA 增加, 一般洗脱三次后基本上能将单链 DNA 洗脱完全, 若继续洗脱则洗脱液中放射性仅占总放射性的 2—3%。

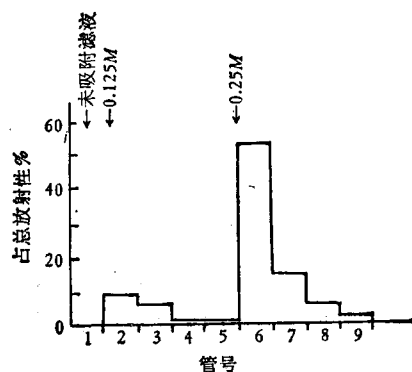


图 2 未照射细胞 DNA 洗脱分布图

DNA 在硷溶液中发生的解旋与溶胞液离子强度、温度、粘度、溶胞时间以及 DNA 两个解旋点间的分子量等因素有关, 细胞内环境的差异 (如粘度不同) 对解旋速度也有影响。解旋常数 (β) 可反映解旋速度的大小。由 Rydberg

* 文中及图中数据均为 $\bar{x} \pm SE$ 。

经验公式^[9]变换后可得:

$$0.5^{\beta} = \frac{\ln F30'}{\ln F60'} \quad (2)$$

式(2)中 $F30'$ 和 $F60'$ 分别为溶胞 30 分钟和 60 分钟后的 dsDNA%。由三次实验测得 L_{m12} 细胞的 β 值为 0.44 ± 0.03 , 与理论解旋常数 $(0.4-0.5)^{[9]}$ 相符合。

(三) γ 线照射后 L_{m12} 细胞 DNA 单链断裂及其重接测定

dsDNA% (F) 随照射剂量 (D) 的增加而减少, 在半对数坐标上有很好的负线性关系(图 3)。其回归直线方程为

$$\log F = -0.01357D - 0.1108$$

两者相关性非常显著 ($r = -0.9995$)。照射前后细胞活力均在 99% 以上。

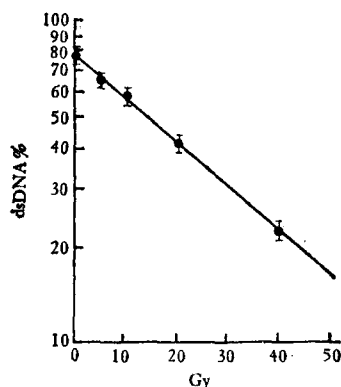


图 3 DNA 单链断裂的剂量效应关系

增加溶胞液离子强度还可检测低剂量(1—10Gy) 照后细胞 DNA 单链断裂, 也可得到上述剂量效应线性关系(结果从略)。

照射后细胞在 RPMI 1640 培养液(含 20% 未灭活马血清)中于 37℃ 孵育, dsDNA% 随着孵育时间增加而逐渐增高, 表明单链断裂后重新连接(图 4)。然而在冰水浴中未见这一变化, 故证实 DNA 链断裂重接是酶促反应过程, 受温度的影响很大。重接过程由快慢两部分组成, 30 分钟前重接较快, 30 分钟后重接速度减慢。此重接规律与文献报道的相似^[6-8]。20Gy 照后 30 分钟或 40Gy 照后 120 分钟, dsDNA% 即可达到或接近照前水平(重接率分别为

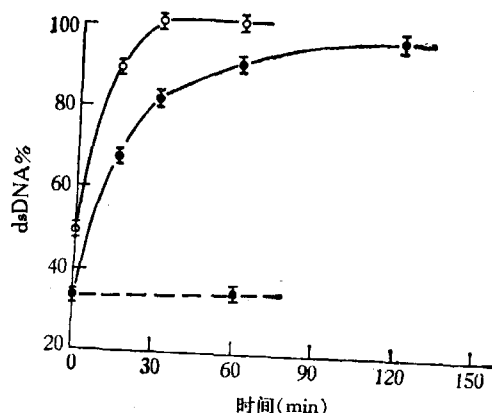


图 4 DNA 单链断裂重接过程

○——○ 20Gy, 37℃; ●——● 40Gy, 39℃;
●——● 40Gy, 0℃

102.4% 和 96.4%), 即单链断裂基本上可以完全重接。在孵育过程中细胞活力无明显变化。

讨 论

HA 离心法是以 DNA 解旋理论为基础的一种简便快速、高灵敏度检测 DNA 单链断裂的方法。本实验对 Kanter 等^[2]的方法进行了以下几方面的改进:

(1) 在 Kanter 等的实验中, 溶胞样品和洗脱液中均含有 10—20% 的甲酰胺, 否则未受照细胞 dsDNA% 仅 20% 左右。甲酰胺是一种 DNA 变性试剂, 其对 DNA 洗脱过程有何影响, 作者未作解释。为了避免增加人为影响因素, 节省试剂, 我们不用甲酰胺处理, 同样可获得较好结果。(2) 文献上介绍用旋转方法使 DNA 和 HA 混合, 我们观察到这样不能使之充分混匀, 因此改用细玻璃棒搅匀, 这样不改变 DNA 单、双链的洗脱特性, 还可减少单链 DNA 的污染。(3) 在洗脱双链 DNA 时将水浴温度提高至 80℃ 可增加洗脱效率, 且可提高回收率。实验结果表明, 改进后的方法能有效地分离纯化的或细胞 DNA 单、双链, 重复性好、回收率高。用本法检测得到的 DNA 单链断裂剂量效应线性关系以及重接规律均与文献报道一致。由于具有较高的灵敏度, 就有可能应用本法在生物照射剂量范围内研究 DNA 损伤修复与细胞存活间的关系。

本法中 HA 质量和溶胞条件对结果影响很大。实验中发现有些批号 HA 分离效果较差,正常细胞 dsDNA % 也仅 30 % 左右。因此我们严格选用晶体大而完整,存放时间不超过二年的 HA。0.4—0.5g HA 分析细胞量为 10^5 — 10^7 个时对结果影响不大。此外 HA 离心法分离后的 DNA 单、双链亦可用荧光法测量,以检测不分裂细胞 DNA 链断裂。

溶胞过程中震荡或见光都可使 dsDNA % 减少,因此应尽量避免。本实验所用 L₇₇₁₂ 细胞溶胞后粘度很高,中和后稍加震荡则出现絮膜状物,对结果有影响。若中和后立即超声处理可降低粘度,絮膜状物也不再出现,且实验重复性好。

在严格控制溶胞及洗脱条件后,应用本法检测未照射细胞仍可测得 20—30 % 的单链 DNA,文献中也有类似报道^[9-11]。这可能是由于细胞 DNA 分子内存在对硷不稳定部位所致。此外在加液时不可避免的剪切作用也可能引起

单链 DNA % 的增加。但在同一实验条件下,对观察 DNA 链断裂的剂量效应关系以及重接过程影响不大。

参 考 文 献

- [1] Ahnström, G. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **23**, 285, 1973.
- [2] Kanter, P. M. et al.: *Anal. Bioch.*, **97**, 77, 1979.
- [3] 郑升等:《肿瘤》, **2**, 1, 1982.
- [4] 郑秀龙等:《第二军医大学学报》, **2**, 131, 1983.
- [5] Rydberg, B.: *Radiat. Res.*, **61**, 274, 1975.
- [6] Modig, H. G.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **26**, 493, 1974.
- [7] Roots, R. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **27**, 595, 1975.
- [8] Mitani, H. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **41**, 85, 1982.
- [9] Ahnström, G. et al.: *DNA Repair Mechanisms* (edited by Hanawalt, P. C. et al.), Acad. Pr. N. Y. p469, 1978.
- [10] Rydberg, B. and Johanson, K. L.: *Radiat. Res.*, **64**, 281, 1975.
- [11] Nilsson, S. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **39**, 107, 1981.

[本文于1983年11月5日收到]

假肥大型肌营养不良症患者红细胞膜流动性的 ESR 研究

卢 景 霁

(中国科学院生物物理所)

沈定国 董 伟

(解放军 301 医院)

假肥大型进行性肌营养不良症 (DMD) 是一种遗传性肌肉变性疾病。本病在 2—3 岁发病,表现为行走缓慢,奔跑困难,下蹲后出现严重肌肉乏力,肌腱挛缩,关节畸形,只能强迫卧床,并于 25 岁以前死亡。研究该病的发病机制对寻找治疗及预防措施是很有意义的。大量的材料说明,此症患者的肌膜异常在临床检查中有重要意义。膜的“缺陷”也出现在其他的膜系,如红细胞膜^[1,13]。

我们曾报道该病患者红细胞膜 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATP 酶异常^[2,3]。本文报道用 ESR 技术进一步研究该病患者的红细胞膜的流动性。实验结果为患者的红细胞膜的 EPR 波谱的序参数较正常

对照组低,这表明膜流动性增加。

材 料 与 方 法

病人组为 5—16 岁 (平均 9.7 岁) 的假肥大型肌营养不良症患者,经肌电图,血清 CPK,肌红蛋白等检查确诊。对照组 7—13 岁 (平均 9.7 岁),其年龄和性别与病人组相对应。

红细胞膜的制备 抽取静脉血 2 毫升,用 EDTA 抗凝,经 510g 离心两分钟后用滴管吸出血浆层。红细胞用 50mM Tris-HCl-1mM EDTA 生理盐水 (pH7.4) 等渗溶液洗三次,每次 310g 离心两分钟。然后按 1:20 向洗净的红细胞中加入预冷的 10mM Tris-HCl 缓冲液,摇动数次后