

简 报

碱性凝胶电泳定量测定非标记 DNA 的单链断裂

严 涛 吴加金 孙丽亚 魏 康

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

关键词 碱性凝胶电泳, 单链断裂, DNA 损伤, 紫外线

DNA 单链断裂 (Single Strand Breaks, SSB) 的测定是研究 DNA 损伤与修复的重要检测方法之一。用碱性琼脂糖凝胶电泳测定 SSB 的最早报告见于 1979 年^[1], 但直到 1986 年才由 Freeman 推导出相应的定量计算公式^[2], 此后该方法被广泛应用^[3,4]。该法除不需同位素标记和操作简单快捷外, 还能够进行定量测定。我们参考 Freeman 的推导公式, 编制了一套计算机分析程序, 在计算机上附加 A/D 板并与激光扫描仪联机, 从而实现了 SSB 的定量检测。

SSB 的模型采用紫外线 (UV) 损伤系统, 已知 UV 辐射在 DNA 引起的主要损伤产物为环丁烷嘧啶二聚体 (5,6-cyclobutyl dipyrimidines, PD), 一种已经得到分离纯化的 DNA 修复酶——T4 核酸内切酶 V 可以特异识别 PD, 并在 PD 位点切断磷酸二酯键, 造成 SSB。

材 料 与 方 法

1. 细胞培养和 UV 照射 小鼠乳癌细胞株 SR-1 于实验前 2d 以 4×10^4 细胞接种在 75 mm 培养皿中, 于 RPMI 1640 培养液 (含 10% 小牛血清), CO₂ 温箱内培养。照射时, 先弃培养液, 用磷酸盐缓冲液洗一遍细胞, 再 UV 照射 (254 nm, $1.17 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 照后立即离心收集细胞 (1200 r/min, 8 min), -20°C 保存, 供下一步使用。

2. 提取细胞 DNA 参照 Komura 方法^[4], 在 eppendorf 管内进行 (2×10^4 细胞/管)。

3. 酶作用及碱电泳 每个样品分取两份, 各含 $3 \mu\text{g}$ DNA, 其中一管加入 $10 \mu\text{l}$ T4 核酸内切酶 V (本室制备^[5], $0.06 \mu\text{g}$ 蛋白/ μl), 另一管加入酶反应缓冲液作为对照, 37°C 保温 2h, 然后加入 1/5 体积的碱性载样缓冲液 (0.5 mol/L NaOH, 5 mmol/L EDTA Na₂, 12.5% Ficoll 400, 0.25% 溴甲酚绿), 上样至碱性电极液 (30 mmol/L NaOH, 2 mmol/L EDTA Na₂) 预平衡 1h 的 0.4% 琼脂糖凝胶, 室温下电泳,

40V , 2.5h , 电泳后将凝胶在 0.1 mol/L Tris (pH 8.0) 中浸泡中和 30 min, 移至 $1 \mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭溶液中浸泡 1h, 长波紫外灯下照相。

4. 联机系统及计算 将激光光密度扫描仪 (LKB 2202) 与 IBM-PC 计算机联机, 由扫描仪对 DNA 电泳图谱负片进行密度扫描, A/D 转换器将扫描仪的输出信号转换为数字。联机系统的软件包括信号采集, 曲线显示, 数据贮存, 计算及打印。为增加测量准确度, 还采用多次扫描采集数据后叠加的方法, 减少电泳区带横向光密度不均所造成的误差。在确定扫描起点及扣除基底等过程中均采取人机对话方式。数据处理所依据的 Freeman 公式为

$$L(x) = \frac{C}{x - x_0} - \frac{C}{x_0 - x_\infty}$$

式中 C 为凝胶常数, x_∞ 和 x_0 分别为无限长和零长度的 DNA 迁移距离。通过测量一组分子量标准物的迁移距离, 按最小二乘法求解公式中各参数, 进而积分算出数均分子长度 (L_n), 最后根据下列公式算出每 kb DNA 中的酶敏感位点 (endonuclease-sensitive-sites, ESS), 它们代表了 SSB 的数量,

$$\text{ESS/kb} = 1/L_n(+\text{endo}) - 1/L_n(-\text{endo})$$

式中 $L_n(+\text{endo})$ 和 $L_n(-\text{endo})$ 分别为加酶组与不加酶对照组的数均分子长度。

结 果 与 讨 论

图 1 是 SR-1 细胞经不同 UV 剂量照射后的 DNA 碱电泳图谱。UV 剂量分别为 5, 10, 20, 40, 60, 80 J m^{-2} , 电泳前经 T4 核酸内切酶 V 处理以在 PD 位点引起 SSB, 同时每组均设不加酶对照组。

图 2 是图 1 负片的激光扫描图谱 (只显示酶处理组)。可以清晰地看出随 UV 剂量增加, T4 核酸内切酶 V 所识别的敏感位点 (PD) 亦增加, SSB 数随之增加, DNA 片段变短而迁移率加快, 扫描峰呈现向低分子区域移动。

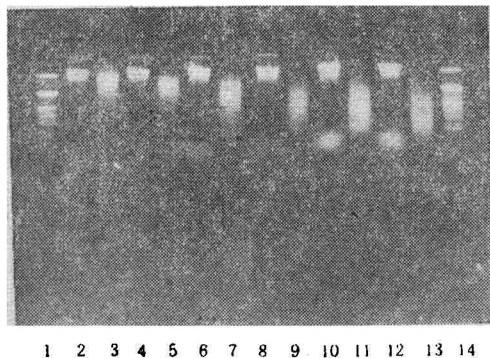


图1 不同 UV 剂量所致 ESS 的碱电泳图谱

UV 剂量分别为 5(孔2,3), 10(孔4,5), 20(孔6,7), 40(孔8,9), 60(孔10,11), 80 Jm^{-2} (孔12,13), 其中孔3,5,7,9,11,13加 T4 核酸内切酶 V 处理, 余为不加酶对照。孔1和14为分子量标准物, 从上到下依次为 T4 DNA (166kb), λ DNA (48.5kb), HindIII 酶切 λ 片段 (23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03kb)

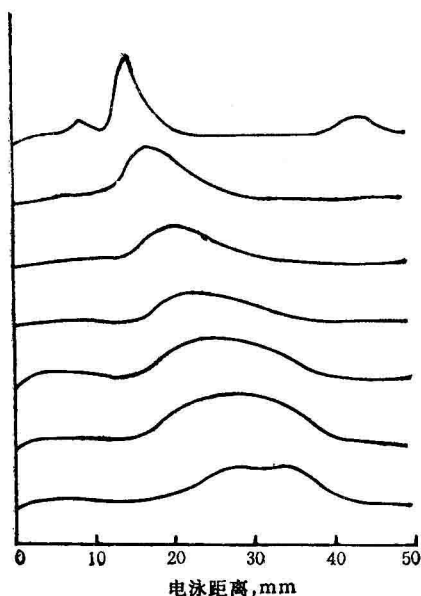


图2 不同 UV 剂量所致 ESS 的激光扫描图谱

从上到下依次为: 不加酶对照组, 5, 10, 20, 40, 60, 80 Jm^{-2} 照射组

由计算机对上述激光扫描结果进行积分计算, 可得出每一剂量下每 kb DNA 所含的 ESS 数, 并得出相应的剂量关系曲线(图3)。

从图3可看出, 在 5-80 Jm^{-2} 范围内照射剂量与 ESS/kb 间呈良好的线性关系, 回归方程为 $r = 0.485x - 0.961$, 相关系数 $r = 0.996$ 。测定灵敏度为 0.002ESS/kb, 相当于 6.5 损伤位点/ 10^5Da , 略高

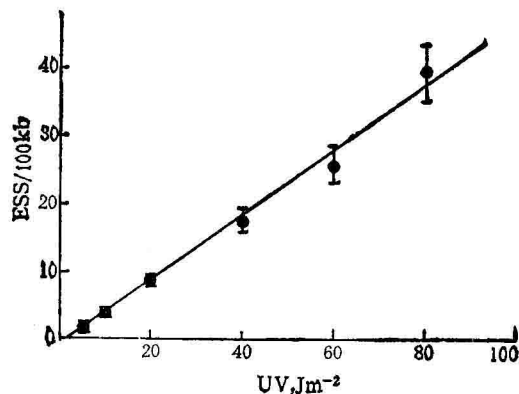


图3 ESS 产生的剂量关系曲线

于文献报告的碱性蔗糖密度梯度沉降法的灵敏度(1—2损伤位点/ 10^5Da)。

本方法不需同位素预标记细胞 DNA, 从而可对一些难以进行预标记的细胞样品如直接取自人体的细胞进行修复测定。减少细胞用量也是扩大本法应用的因素之一, 我们曾尝试用低熔点琼脂糖包埋法提取细胞 DNA, 只需 5×10^4 个细胞就可做出结果, 且提取方法非常简便。但该法所提 DNA 的电泳图谱不够干净, 可能该法较温和, 对 DNA 的剪切作用小, DNA 分子较大, 在短时间电泳下不能达到很好分离的目的, 如改用交变电场电泳可能会得到较好结果。

本文选用 UV 做致伤因子, 所测得的 SSB 等于 T4 核酸内切酶 V 的敏感位点数, 故用 ESS/kb 表示。理论上说, 本法可应用于能直接或间接引起 SSB 的任何致伤因子, 如一些烷化剂在 DNA 上引起碱基结构改变, 形成碱不稳定位点, (alkali-labile-sites, ALS), 在碱性条件下产生 SSB, 可用 ALS/kb 表示。

参考文献

- 1 Achey P M, Woodhead A D, Setlow R B. *Photochem Photobiol*, 1979; 29: 305
- 2 Freeman S E, Blackett A D, Monteleone D C et al. *Anal Biochem*, 1986; 158: 119
- 3 Freeman S E, Applegate L A, Ley R D. *Photochem Photobiol*, 1988; 47: 159
- 4 Komura J, Mitani H, Shima A. *Photochem Photobiol*, 1989; 49: 419
- 5 严涛, 孙丽亚, 魏康等. 生物化学杂志, 1990; 6(4): 382

[本文于 1990 年 9 月 17 日收到, 11 月 12 日修回]