

nuclear nucleases of rat thymocytes and their changes in radiation-induced apoptosis. *Eur J Biochem*, 1993, **215**: 893~ 901

13 Deng G, Podack E R. Deoxyribonuclease induction in apoptotic cytotoxic T lymphocytes. *FASEB J*, 1995, **9**: 665~ 669

14 Barry M A, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **300**: 440~ 450

15 Fernandes R, Cotter T G. Activation of calcium magnesium independent endonuclease in human leukemic cell apoptosis. *Anticancer Res*, 1993, **13**: 1253~ 1260

16 Walker P R, Weaver V M, Lach B *et al.* Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res*, 1994, **213**: 100~ 106

17 Brown D G, Sun X M, Cohen G M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 3037~ 3039

18 Sun X M, Cohen G M. Mg^{2+} -dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 14857~ 14860

19 Zhivotovsky B, Cedervall B, Jiang S *et al.* Involvement of Ca^{2+} in the formation of high molecular weight DNA fragments in thymocyte apoptosis. *Biophys Res Commun*, 1994, **202**: 120~ 127

20 Kotaoka A, Kubota M, Wakazono Y *et al.* Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or nonapoptotic cell death induced by calcium ionophore. *FEBS Lett*, 1995, **364**: 264~ 267

21 Sokolova I A, Cowan K H, Schneider E *et al.* Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endonuclease activation is an early event in VP-16-induced apoptosis of human breast cancer MCF cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1266**: 135~ 142

22 Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, 1994, **16**: 279~ 288

23 Zhivotovsky B, Wade D, Cahm A *et al.* Formation of 50 kb chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. *FEBS Lett*, 1994, **351**: 150~ 154

Function of Nucleases in Apoptosis. DENG Youping, XIAO Peigen (*Institute of Medicinal Plant, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China*).

Abstract Nucleases play a direct and important role in DNA fragmentation which is a hallmark of apoptosis. The nucleases involved in apoptosis are divided into two types: divalent cations dependent nucleases and divalent cations independent nucleases. The divalent cations dependent nucleases mainly include nuc18, DNase I, Ca^{2+}/Mg^{2+} nuclease, Ca^{2+}/Mn^{2+} nuclease, DNaseV, nuc58 and nuc40; The divalent cations independent nucleases mainly include DNase II and DNase II like nucleases. Moreover, the effect of nucleases on chromatin DNA degradation and the mechanism of this process were discussed.

Key words nuclease, apoptosis, DNA fragmentation

DNA 链断裂检测技术的进展*

夏 璐 丘冠英¹⁾

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 DNA 链损伤特别是 DNA 双链断裂 (dsb) 的检测方法是研究 DNA 辐射损伤的一个关键因素. 已发展的检测 DNA dsb 的方法很多, 但各种检测法均有其一定的优越性和适用范围, 近年来应用较多并日益受到重视的新方法有原位杂交法, 彗星试验 (单细胞电泳法) 以及高效毛细管电泳法等等.

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1996-02-14, 修回日期: 1996-06-11

关键词 DNA 双链断裂 (dsb), 检测方法, DNA 损伤

在各种电离辐射引起的一系列生物学效应中, 细胞内 DNA 双链断裂 (dsb) 被认为是最重要的分子损伤, 引起了人们越来越大的兴趣. 一些传统的检测 DNA 双链断裂的技术经过不断改进, 发展而沿用至今, 同时更不断出现了一些更新颖, 简便, 快速的方法, 本文仅就当前国内外较流行的方法作简要介绍和评述.

传统的中性蔗糖沉降技术, 中性滤膜洗脱技术对于在高剂量 (如 20 Gy) 下产生的 DNA 大片段无能为力, 它们只适用于小分子 DNA 以及低敏感性的细胞^[1], 而且得到的结果不能保持稳定, 另外该方法中的剪切过程在实际运用中会增加 dsb 的数量, 影响实验结果. 80 年代发展的 PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) 即脉冲电场凝胶电泳法以多种形式得到广泛的应用, 可间接地检测 DNA dsb 及其修复, 但要想得到 dsb 的绝对值则需要完全分离所有 DNA 片段, 所以不能用来研究哺乳动物细胞辐照后 DNA 损伤的修复. 但 PFGE 技术的优势在于它克服了中性洗脱法的困难, 而且可得到稳定的测定结果, 对分裂期细胞, 泳动的 DNA 片段可以通过预先标记的 ³H-dT, 切下待测胶块, 悬浮, 从而计算出 DNA 的片段; 对于非分裂期的细胞, 则可以通过扫描荧光计来定量计算 DNA 片段^[2]. 总的来说, PFGE 技术比中性过滤洗脱更灵敏 (可达 1 Gy)^[3], 还能提供 DNA 片段进入胶板后其大小的有关信息, 当然这些要取决于所选择的 PFGE 系统及电泳条件.

在已有的检测 DNA dsb 及修复技术中, PFGE 是最具有潜力的一种, 正因为如此, 研究者在此基础上不断改进, 出现了多种新兴的, 改进后的检测方法. 其一, 反向电场凝胶电泳 (field-inversion gel electrophoresis, FIGE). Kysela 等^[4]将实验细胞包埋在琼脂糖内, 再放入 FIGE 设备中电泳, 这样便能在照射后较短时间内精确检测 DNA dsb. 但 FIGE

技术要求细胞及琼脂糖的浓度必须恰当, 这样才能保证 dsb 完全, 有效地重接, 而且在照射后保温期间, 细胞 DNA 不致有显著降解. 该方法在动物细胞 DNA 损伤方面已有广泛应用, 但对植物 DNA 损伤修复的研究则远不如动物细胞. 我们室近年将反向电场凝胶电泳技术引入植物细胞辐射生物学研究, 并与图像分析扫描结合, 建立了一种测定蚕豆种子原生质体 DNA dsb 的方法, 并取得了较满意的结果^[5]. 其二, 不对称反向电场凝胶电泳 (asymmetric field-inversion gel electrophoresis, AFIGE). Stamato 等^[6] (1990 年) 在 FIGE 技术上加以改进, 定时改变电流的方向 (180 度改变), 在两个方向上所加的电场强度也不同, 脉冲涨落时间偏向一个方向这样就可以得到电泳净迁移, 由槽中迁移出的 DNA 片段来定量计算 DNA 断裂的数目. 与 FIGE 不同的是, AFIGE 法是将 DNA 强制性地压往低电压场. 这可以通过在低电场方向延长脉冲时间而实现.

总之, PFGE 及其各种衍生技术在生化及遗传学研究方面有着广泛的应用前景, 但若 PFGE 系统的电场不一致, 当研究多种样品 DNA 的 dsb 时就会很困难. 为解决这一难题, Blocher 和 Kuhni 1980 年提出了钳位均匀电场电泳 CHEF 系统 (contour-clamped homogeneous field), 他们在多边形电泳槽沿边安装了多个电极, 预先测定好各点的电势, 使槽内产生一致的电场. 但无论是 PFG 系统的 AFIGE, 还是 CHEF 系统都要求进入胶板的 DNA 片段小于某个阈值分子质量, 而不适用于大范围 DNA 分子, 它们还缺乏低剂量时检测 dsb 的高灵敏度, 以及单个系统检测的快速. 为此, 在 CHEF 系统的基础上应运而生 PACE——程序自动控制电极技术 (programmed autonomously controlled electrode), 它的发展使脉冲电场凝胶电泳技术在设计上更为灵活, 因为六边形封闭的槽内安装的 24 个

电极每个都能独立控制. 因此 PACE-PFG 系统的主要优势就表现在电泳过程中任意时刻自动控制开关角度 (0~ 360 度), 这种灵活性不仅可以提高分辨率, 而且还能增加分离的线性范围并减少电泳时间^[7].

琼脂糖凝胶电泳技术要想定量检测 DNA dsb, 通常要用到放射性标记 DNA, 即将带有放射性标记的胸苷 (T) 引入 DNA, 这样其应用范围就仅限于生长细胞. 为了避免使用放射性标记, Sandhu 等^[8] 发展了一种在含有大量琼脂糖时定量检测 DNA 的荧光测定法. 该技术是将凝胶溶于高氯酸钠, 用 CdCl_2 选择性沉淀 DNA, 通过 3, 5-二氨基苯甲酸 (DABA) 来估算 DNA 的量. 但这种技术在沉淀 DNA 时需要载体 RNA, 为了尽可能提高灵敏度, 载体 RNA 分子质量必须很高, 才能与 DNA 形成共沉淀, 在所有用到的商品 RNA 中, 只有 *E. Coli* tRNA 最令人满意.

近年来, 国际上用到的检测技术还有:

a. 荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 目前它已经发展成为一项可以目测某个中期或中间相细胞特定 DNA 序列的实用技术, 并正独立应用于, 或结合细胞遗传学, 分子遗传学而应用于检测与遗传病有关的遗传缺失, 并已用于辐射生物学和癌症研究. FISH 是将生物素标记的全长染色体探针与辐射损伤后的染色体杂交, 在这个过程中, 靶和探针 DNA 序列被变性, 混合, 这样探针便与细胞中与之高度同源的区域结合, 结合后的探针在光学显微镜下便于观察. 最初的探针都带有放射性标记, 通过放射自显影检测结合探针. 近年发展的非放射性探针及其检测技术更进一步提高了检测特定序列的速度和准确性. 第一个用到的探针是生物素酰 dUTP 存在下经缺刻平移得到的报道分子生物素 (reporter molecular biotin), 杂交探针则通过用亲和素或抗生物素抗体偶联到一个酶或一个荧光分子上来探测^[9]. 从那以后, 其他类型的报道分子也相继发展起来, 包括水银、乙酰氨基苄 (AAF) 和洋地黄毒苷. 免疫化学探

针检测方法结合信号放大技术 (如用亲和素-荧光染料, 生物素酰抗亲和素等) 可以使长度在 1 kb 到几百兆碱基对的靶序列在显微镜下观察到. 最近有报道, 探针本身也被荧光标记, 这样上述第二步检测也就不再需要, 使杂交过程的速度更快, 方法更简便.

FISH 技术的缺点是对微小的变化, 如微缺失和微突变不灵敏, 引物原位标记 (PRINS) 正是克服这一局限而发展起来的^[10]. 在这种方法中, 与靶序列同源的短的人工合成寡核苷酸链参与杂交, 然后在标记的三磷酸核苷酸 (如生物素-11-dUTP) 存在下利用多聚酶原位延伸. 该方法用作两步检测 (如掺入生物素酰, 然后用亲和素-FITC 检测) 已获成功, 最近还有掺入荧光标记的三磷酸核苷酸, 也取得了成功. 今天, PRINS 主要用来检测染色体特异的 α 卫星序列的染色体定位和核间定位, 并且用来成功地检测寡核苷酸与特定的 DNA 序列与 mRNA 之间的杂交. 由于这一技术原理依赖短寡核苷酸的杂交, 因此在理论上必须要求达到邻近单个碱基识别的敏感度. PRINS 的主要缺点是探测单一序列的效率较低, 不适于作基因拷贝变化的分析.

染色体的断裂和后续的错误修复或缺少修复是电离辐射诱发细胞致死的决定因子, 但是许多研究都只有在染色体可见时才能计算染色体的损伤, 这就意味着细胞必须培养到有丝分裂期. 而 FISH 技术则解决了这个问题, 它的优点在于当分析超前凝集染色体 (PCC) 的 DNA 损伤时, 有丝分裂期的细胞与中期细胞融合, 迫使 PCC 进入中期细胞核^[11], 在 G_1 期只能看到一条延伸的染色体, 而在 G_2 期, 两条染色体都能识别, 细胞中染色单体进行复制, 不凝集, 这样 S 期细胞的染色体就具有特征片段模式. FISH 正是利用一种或几种全长染色体探针来大大简化染色体断裂和交换的检测工作.

b. 彗星试验 (comet assay), 或称单细胞电泳法. 早在 1984 年, Ostling 等^[12] 即以此法分析单个哺乳细胞内辐射诱发的 DNA 损

伤, 他们将单细胞包埋在琼脂糖内, 置于显微镜盖玻片上, 经裂解, 电泳, 溴化乙锭染色观察 DNA, 当用荧光显微镜观察时, 发现未损伤细胞的 DNA 在裂解细胞形成的空洞外呈现出一个球形, 继续进行辐射, 损伤的 DNA 分子逐渐从这个球形物质中“流”出来, 朝着阳极形成一个彗星图案. 早期用这种方法检测 DNA 损伤时, 用头部中心处的荧光强度与沿迁移方向已知距离处的荧光强度之比来表示 DNA 损伤强度, 用显微照像底片测出尾长^[13]、总彗星长度^[14]、头部直径与尾长之比^[15]等线性数据. 新近 Gedik 等^[16]将彗星的显微照片分为四大类, 并计算每个类中彗星所占的比例. 该技术后来经 Oliver 等改进, 能更灵敏地定量检测 DNA 损伤. 他们提出了一个新概念——“tail moment”, 即“彗星”尾部中 DNA 的比例与头部中心到尾部中心的距离之积. 这个参数更好地定量表示出 DNA 的损伤, 它不仅有 DNA 迁移距离的指示, 还有 DNA 从头部迁移出的量的表示 (图 1). Kent 等^[17]用这一技术检测了 CHO-K1 细胞的 DNA 损伤, 发现彗尾的长度随剂量呈线性增加, 并在某一剂量达到饱和而不再增加.

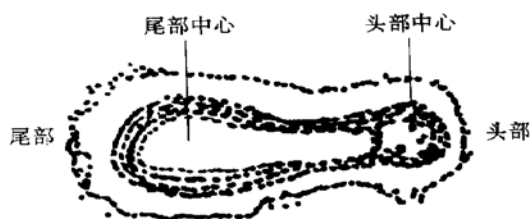


图 1 “tail moment”示意图

“tail moment” = 尾部 DNA% × 头部与尾部中心距离.

c. 高效毛细管电泳 (high performance capillary electrophoresis, HPCE) 作为一种重要的分离分析方法, 已引起生命科学各领域以及相关学科的极大重视. HPCE 包括毛细管筛分电泳 (CGE) 和毛细管无胶筛分电泳 (NGS) 两类, 它们均以样品分子大小作为分离基础. 1990 年, Lux 和 Xin 等提出用线性

聚丙烯酰胺对柱内表面预处理和用 γ 射线引发聚合的方法, 在分离 DNA 片段和寡聚核苷酸时得到了极高的分辨率. 但由于凝胶毛细管柱制备困难, 寿命短, 进样端易堵, 许多人开始探索用低交联或无交联的聚丙烯酰胺柱, 一般将这种在电解质溶液中加入水溶性高分子聚合物的溶液体系称作无胶筛分电泳 (NGS) 体系. 它同时具有抗电渗流和筛分的作用, 柱效高, 易于制备, 目前已被逐步应用于低聚核苷酸链反应产物的分离研究领域. NGS 应用于 DNA 序列分析具有快速, 分辨高, 能在线检测并易于自动化等特点, 因而在 DNA 碱基损伤, 链断裂及突变分析上有着巨大潜力^[18].

除上述方法外, 还有 DNA 印迹^[19], 高效液相色谱^[20], 气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[21], 碱性微胶电泳 (alkaline microgel electrophoresis)^[22], 序列凝胶电泳 (sequencing gelelectrophoresis)^[23] 等等, 由于篇幅所限, 这里不一一介绍, 读者可参阅有关文献.

由于科学家们对电离辐射引起的细胞致死的分子机制日益重视, 越来越多的研究将转向 DNA 的损伤, 尤其是 DNA dsb 及与终点效应的关系, 随着分子辐射生物学研究的不断深化, 有关 DNA 辐射损伤与修复、DNA dsb 与辐射致突、致癌分子机理的研究已成为当前研究热点之一. 因此可以预期, 上述技术将得到进一步发展完善, 还会出现更多思路更新, 方法更快捷, 更灵敏的检测手段, 从而将 DNA 损伤与修复的研究引向一个新的高峰.

参 考 文 献

- 1 Akpa T C, Weber K J, Schneider E *et al.* Heavy ion induced DNA double-strand breaks in yeast. *Int J Radiat Biol*, 1992, **62**: 279~287
- 2 Tobi S E, Itzhaki R F. DNA double-strand breaks measured by PFGE in irradiated lymphocytes from normal humans and those with Alzheimer's disease. *Int J Radiat Biol*, 1993, **63** (5): 617~622
- 3 Erixon K, Cedervall B. Linear induction of DNA-strand breakage with X-ray dose, as determined from DNA frag-

- ment size distribution. *Radiat Res*, 1995, **142**: 153~ 162
- 4 Kysela B P, Michael B D, Arrand J E. FIGE analysis of the induction and rejoining of DNA double-strand breaks in cells embedded in agarose. *Radiat Res*, 1993, **134** (1): 107~ 111
 - 5 蒋达和, 冯胜彦, 彭银洋等. 植物细胞 DNA 双链断裂及其重接修复的研究. 武汉大学学报 (生物物理专刊), 1993 年增刊, 87~ 91
 - 6 Stamato T D, Denko N. Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res*, 1990, **121** (2): 196~ 205
 - 7 Ella M C, Nichols W W. Application of programmable autonomously controlled electrode (PAGE) technology to the development of an improved pulsed field gel electrophoresis assay for DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Int J Radiat Biol*, 1993, **63** (1): 7~ 11
 - 8 Sandhu J K, Birnboim H C. Fluorometric determination of DNA in agarose gels: usefulness for measurement of double-strand breaks in non-labeled cells by PFGE. *Radiat Res*, 1993, **135** (3): 338~ 342
 - 9 Langer P, Waldrop A, Ward D. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (11): 6633~ 6637
 - 10 Gray J W, Pinkel D, Brown J M. Fluorescence *in situ* hybridization in cancer and radiation biology. *Radiat Res*, 1994, **137** (3): 275~ 289
 - 11 Koch J, Mogensen J, Pedersen S *et al.* Fast one step procedure for the detection of nucleic acids *in situ* by primer induced sequence-specific labeling with fluorescein 12-dUTP. *Cytogenet Cell Genet*, 1992, **60**: 1~ 3
 - 12 Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoresis study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, **123**: 291~ 298
 - 13 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, **175**: 184~ 191
 - 14 Deeley J O T, Mitchell S, Sanders A *et al.* Microgel electrophoresis: a predictive test of radiosensitivity. *Int J Radiat Biol*, 1991, **60**: 947
 - 15 Olive P L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in CHV79 spheroids. *Radiat Res*, 1989, **117**: 79~ 92
 - 16 Gedik C M, Ewen S W B, Collins A R. Single-cell gel elec-

trophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol*, 1992, **62**: 313~ 320

- 17 Kent C R H, Eady J J, Ross G M *et al.* The comet moment at a measure of DNA damage in the comet assay. *Int J Radiat Biol*, 1995, **67** (6): 655~ 660
- 18 郭 栩, 薛 俊, 张 岩. 毛细管无胶筛分电泳. 生物化学与生物物理进展, 1995, **22** (5): 403~ 407
- 19 Morgan T L, Fleek E W, Poston K A. Molecular characterization of X-ray-induced mutations at the HPRT locus in plateau phase CHO cells. *Mutat Res*, 1990, **232** (2): 171 ~ 182
- 20 Zheng S, Newton G L, Ward J F *et al.* Aerobic radioprotection of pBR322 by thiols: effect of thiol net charge upon scavenging of hydroxyl radicals and repair of DNA radicals. *Radiat Res*, 1992, **130**: 183~ 193
- 21 Mori T, Hori Y, Dizdaroglu M. DNA base damage generated *in vivo* in hepatic chromatin of mice upon whole body γ -irradiation. *Int J Radiat Biol*, 1993, **64** (6): 645 ~ 650
- 22 Singh N P, Stephens R E, Schneider E L. Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol*, 1994, **66** (1): 23~ 28
- 23 Isabelle V, Prevost C, Spothheim-Maurizot M *et al.* Radiation induced damages in single and double strand DNA. *Int J Radiat Biol*, 1995, **67** (2): 169~ 176

Recent Progress of Methodology in Measuring DNA Damages. XIA Lu, QIU Guanying (School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract To study the damage of DNA, methodology of measuring DNA double-strand breaks (dsbs) is of critical importance. Many methods have been used, but each has its advantage and limitation. Recently, researchers often use some advanced methods, such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH), comet assay (or single-cell electrophoresis, SCE), high-performance capillary electrophoresis (HPCE) etc.

Key words DNA double-strand breaks (dsbs), measuring methods, DNA damage