

一种简化的检测细胞 DNA 单链断裂及其重接修补的 Kohn 碱液洗脱法

周启玲 陈去恶

(中国科学院生物物理研究所,北京)

Kohn碱液洗脱法,可用于研究电离辐射^[1-3]或紫外线^[4]照射后细胞的 DNA 损伤与修补,致癌化合物对离体^[5]及体内^[6]细胞 DNA 的损伤,以及细胞的正常 DNA 复制^[5]。国内已开始应用^[7](也有采用 pH 值较低的洗脱液研究 DNA 的双链断裂及重接^[8]),近有最新综述^[9]。

我们曾将此法简化,自行设计一种简便的玻璃洗脱器,省去所有蠕动泵,改用廉价的“由”字夹控制洗脱液流速,又用便宜的玻璃比色杯代替石英荧光比色杯,满足了实验要求。我们的方法发表^[10]后,引起了国内同行的兴趣。现将我们使用数年的一些经验与体会介绍如下,供参考。

1. Kohn 碱液洗脱法的原理与操作^[1,2]

1) 胞溶: 将受测细胞铺放在洗脱器中的微孔滤膜上,让含有去污剂的胞溶液流过,引起胞溶;再让低浓度的 EDTA 溶液流过,洗去膜上残留的胞溶液。此时膜上主要只剩下双链 DNA,细胞其他成份的绝大部分已随液体流过滤膜,一起弃去。2) 洗脱: 让碱性(pH 11.96—12.82^[2])洗脱液在蠕动泵的控制下以一定流速通过滤膜,使 DNA 变成单链,同时分子量较小的部份随洗脱液从膜孔流下后,用容器收集;分子量较大的被阻留在膜上。这样,细胞 DNA 就依分子量大小,被分成两部分。对照组细胞,滤膜上剩留量比例很大;受电离辐射或某些致癌物作用的细胞,因为 DNA 有断链,小分子被洗下的增多,因而剩留量比例下降;如细胞保温后发生 DNA 重接修补,膜上 DNA 剩留量又回升。3) 测定: 即测定洗脱和剩留 DNA 的

相对量。如果细胞 DNA 已用放射性 TdR 标记,可用液闪法测定^[1,2];如未标记,则可用荧光法测定^[6]。最后计算出膜上剩留量在总量(洗脱量+剩留量)中所占比例^[4,7,8,10,11];如果在洗脱过程中的按规定时间取样,分别测定,即可画出剩留量变化的动态曲线^[1-6,9]。

2. 微孔滤膜

文献中介绍的用醋酸纤维、聚乙烯、纤维素混合酯或聚碳酸盐制成的微孔滤膜,直径 25 mm,孔径 $1.2\mu^{[1,2]}$ — $5\mu^{[6]}$,最常用的是 1.2 — 2.0μ 。我们用的是上海第十制药厂生产的混合纤维素膜,孔径 1.2μ 。使用前用千分卡测量厚度(只能轻轻接触,不可用力旋扭),按照厚度相差

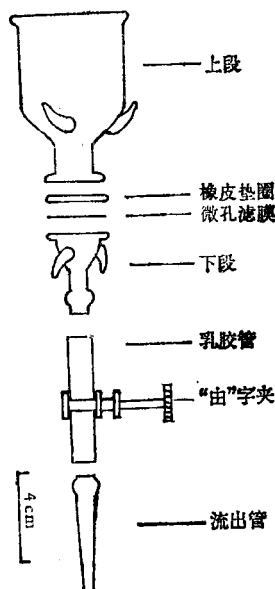


图 1 不用蠕动泵的玻璃洗脱器
上下两段各有玻璃“羊角”3个,相距 120° 。

不超过 10μ 的标准分类保存,每次实验用同一类型的,目的是缩小样品间洗脱误差。

将一张滤膜夹在洗脱器^[10](图1)的上下段之间,两段用橡皮筋拉紧,一般不会漏液;如果在膜上方加放一个橡皮垫圈(上海医工院出品),则更可保证不漏。

3. 洗脱器

洗脱时要求在滤膜上下两方都无气泡。采用 25mm 塑料的针头过滤器(上海医工院产),接上去活塞的 50ml 或 30ml 注射器作为洗脱器,但排除气泡较难,操作也麻烦^[9]。我们将玻璃洗脱器(图1)滤膜的上方敞露^[10],可以避免这种缺点,将装好滤膜的洗脱器倒置,用注射器将下段的空间注满蒸馏水,再翻正过来,将其固定在铁支架上(每架至多可固定 6 个),再在上段加入约 5ml 蒸馏水,立即接上带有流出管的乳胶管,待蒸馏水流出,上段的液面降到滤膜下水平时,流出就自然停止,这样下段就不会出现气泡,此时安上“由”字夹,即可加细胞样品。

4. 加样及胞溶

测定样品的细胞数在 $3 \times 10^5 - 8 \times 10^5$ 个为宜;细胞太少,测定荧光困难,太多则会堵住滤膜孔,致使洗脱量减少,结果不准确。由于每个样品比例数据能分别计算,如果样品间细胞数略有差异,对结果影响不大。

先松开“由”字夹,将悬于 PBS 或培养基中的细胞加进洗脱器,再用少量无钙、镁的 PBS (PBS-A) 将容器壁上残余的细胞涮下,一起加入,让液体自然流过,液面下降到滤膜下水平时自行停止流出。此时细胞已均匀地铺在滤膜上。再加入约 10ml PBS-A, 自然流过,以清洗膜上的细胞。

取胞溶液^[5] (2M NaCl, 0.2% Triton X 100, 0.02M Na_2EDTA , 以 10N NaOH, 调 pH 至 8.2) 6ml, 分三次加入,自然流过,引起胞溶;然后又分三次加入用 1N NaOH 调 pH 至 7.8 的 1mM Na_2EDTA 10ml, 以清洗膜上残留的胞溶液;自然流过后,拧紧“由”字夹。将以上各种流过的液体全部弃去。

5. 洗脱

按照文献要求需用蠕动泵控制洗脱液流速^[1,3,5],在规定时间内完成洗脱,并将滤膜上方剩余的洗脱液弃去。我们改用廉价的“由”字夹控制流速,让一定量的洗脱液流完为止。

因碱性环境中的 DNA 受光照易发生断链,所以洗脱时应避光。我们是在贴有黑纸的玻璃门的柜中洗脱。

取洗脱液(0.01M Na_2EDTA , 0.05M NaOH, pH 12.4) 10ml 加入洗脱器,立即轻轻拧开“由”字夹,开始的流速调到 0.5ml/分(约 6 秒钟 1 滴),用干净的 25ml 烧杯收集。洗脱过程中因上段液面逐渐下降,液压减低,流速自然减慢,但不再作调整。

洗脱液流完,液面自然停止在滤膜下水平。此时用细滴管咀刺破滤膜,洗脱器下段的液体便全部流入收集杯。等滤膜晾干,或过夜*,再取下滤膜及垫圈,放进盛有 25ml 洗脱液的锥形瓶,用刺过膜的滴管吸瓶中液体冲刷洗脱器上段的下口,然后用两支细滴管撕碎瓶底的膜,浸泡 12 小时以上。又将收集杯内液体移入 25ml 容量瓶,用干净的洗脱液涮洗收集杯以及洗脱器下部内壁,用其补充到 25ml 刻度。

每次实验都有不加细胞的空白对照组,与各组同时进行同样的洗脱、处理和测定,作为本底值。样品组的测定值都要减去本底。

6. 荧光测定

荧光测定法^[6]可测定未经放射性 TdR 标记的细胞^[6],免去使用同位素的麻烦,费用较低,特别适用于动物组织中的非分裂细胞,其缺点是操作时间比液闪法长。灵敏度可检出哺乳类 400 个细胞的 DNA 量^[12]。

取上述洗脱液和滤膜浸泡液各 5ml,分别加到盛有 0.5ml 新配制的 0.2% 牛血清白蛋白的 5ml 离心管中,再加入 100% (w/v) 三氯醋酸水溶液 0.5ml,塞紧,摇匀;在冰箱中静置 4 小时以上,用普通的甩平离心机离心 3,500rpm 20 分钟,管底出现白色沉淀;轻轻倒掉上清液,并将管倒置在滤纸上,尽量控去液体,然后沿管壁

* 为增强效果,浸膜用洗脱液中的 NaOH 浓度可加倍,使 pH 值达 12.6。

慢慢加入无水乙醇 3ml (尽量不扰动沉淀物); 再以 35,000rpm 离心 15 分钟; 轻轻倒去上清液, 并倒置在滤纸上控去液体, 然后放入 70℃ 烤箱烤 30 分钟; 取出, 室温下冷却。

以微量注射器对每管底部的沉淀物注上 30 μ l 新配制的 40% 二氨基苯甲酸 (DABA)*, 轻轻盖上橡皮塞, 放 70℃ 烤箱中 30 分钟; 取出自然冷却后加入 0.6N 过氯酸 1.5ml 待测。

用我所研制的 WFD-9 型荧光分光光度计, 测定能高度特异地与 DABA 起反应的脱氧核糖^[12]。文献中报道可用滤光片选择波长, 激发光为 436nm^[6], 或 405—408nm^[12], 读数波长为 520nm^[6,12], 我们曾依照文献用 436nm 激发, 在 520nm 读数^[10]。后改用 414nm 激发, 在 505nm 接受^[11], 灵敏度明显提高, 但细胞数足够时所得比例数无差别。因为激发和读数波长都在可见光范围, 我们改用 Pyrex 玻璃管加工的圆筒形比色杯(外径 11.7mm, 内径 9.4mm, 高 42mm), 代替自日本进口的昂贵的方形石英荧光比色杯, 效果相同。

7. 几点经验

文献中使用的洗脱液含 NaOH 0.1 M^[1,6], 我们曾在人类肝癌细胞材料上用过, 实验组及对照组的 DNA 全部洗脱光, 膜上无剩留。这可能因为我们的洗脱器中滤膜下不用支持筛板, 有效面积增大的缘故。后改用 0.05M, 效果合适。但需防止 NaOH 浓度过低, DNA 变性太少, 洗脱量过低, 或洗脱不下来。需要调整洗脱液中 NaOH 浓度适应不同细胞。我们曾用含 0.05M NaOH 洗脱液洗鲤鱼的有核红细胞, 结果洗脱过度, 后降到 0.0375M 就比较

合适。

为避免样品间误差, 每一次实验的洗脱液要取自同一瓶; 如果瓶中所剩不多, 可以从另一瓶倒入一部份, 摇匀后再用。

最终样品制成后, 如果来不及测荧光, 可塞好暂存在室温下, 24 小时后所测荧光强度不变。

我们通常每组至少有两个相同的样品, 每次实验一人即可操作 23 个洗脱器, 如果条件合适, 可增加到 30 个。

参 考 文 献

- [1] Kohn, K. W. et al.: *Cancer Res.*, **33**, 1849, 1973.
- [2] Kohn, K. W. et al.: *Biochemistry*, **13**, 4134, 1974.
- [3] Kohn, K. W., et al.: *Biochemistry*, **15**, 4629, 1976.
- [4] Fornace, A. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **73**, 39, 1976.
- [5] Swenberg, J. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **72**, 732, 1976.
- [6] Parodi, S. et al.: *Mutation Res.*, **54**, 39, 1978.
- [7] 章扬培等: 《生物化学与生物物理进展》, **1**, 37, 1983.
- [8] 夏寿萱等: 《辐射研究与辐射工艺学报》, **2**(1), 51, 1984.
- [9] Kohn, K. W. et al.: *DNA Repair, A Laboratory Manual of Research Procedures* (Friedberg, E. C. and Hanawalt, P. C., eds.), vol. 1, p. 379.
- [10] 陈去恶, 周启玲, 《生物化学与生物物理进展》, **1**, 37, 1982.
- [11] 陈去恶等: 《动物学研究》, **5**(3), 227, 1984.
- [12] Kissane, J. M.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 184, 1958.

[本文于 1984 年 8 月 25 日收到]

* 上海第二军医大学自制出售的 DABA, 质量比某些进口货更好。