

DNA 断裂检测方法——单细胞凝胶电泳法

秦椿华 沈建英 黄仕和¹⁾ 王光祖²⁾

(同济医科大学工业毒理研究室, 武汉 430030)

摘要 单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE) 也叫彗星试验 (comet assay), 是一种快速、敏感、简便、廉价的检测单个哺乳动物细胞 DNA 断裂的技术, 目前已用于检测氧化、紫外线和电离辐射引起的损伤, 以及三氯乙烷、丙烯酰胺等化学物及老化、吸烟所致损害的研究. 文章介绍 SCGE 的发展、检测分析方法、原理及其在 DNA 损伤与修复、生物监测、遗传毒理研究、肿瘤治疗方案优化和疗效研究方面的应用前景.

关键词 DNA 断裂, 单细胞凝胶电泳, DNA 损伤, DNA 修复, 肿瘤治疗

多种因素, 包括物理的如电离辐射和紫外线 (UV), 化学的如多种氧化剂及三氯乙烷、丙烯酰胺等, 以及混合性的因素如老化、吸烟等均可引起 DNA 单链断裂 (single strand break, SSB), 虽然偶尔的 SSB 不会影响长双链 DNA 分子的连续性, 但却会影响 DNA 的遗传行为. 以前已有一些检测 DNA 断裂的方法^[1], 如在碱性条件下解螺旋和解链, 再通过光学检测 DNA 沉淀性质, 但都不太理想. 而 SCGE 能检出细胞群中 DNA 损伤与修复在细胞间的差异; 它所需样品细胞数目少 (1~10 000 个); 几小时即可出结果; 花费甚少. 它可检出 0.1 个 DNA 断裂每 10^6 ku^[2], 甚至可检测到自然光照射体外淋巴细胞 1 h 所引起的 DNA 损伤^[3], 比 SCE 试验^[4]和 UDS 试验^[5]具有更高的敏感度, 它可用于检测静息状态的细胞, 且对 T、B 细胞均敏感, 不像 SCE 试验仅对 T 细胞、微核试验仅对 B 细胞敏感, SCGE 可能与 ³²P 后标记检测 DNA-外来物加合物的灵敏度一致^[5], 并被认为是低水平辐射 (0.05 Gy) 检测的快速、敏感方法^[6]. 因此, 其应用迅速引起了重视.

由 Rydberg 和 Johanson 等最先提出单细胞损伤定量^[7], 之后, Ostling 等^[8]应用中性凝胶电泳技术使检出灵敏度得到提高. 但 Singh 等^[9]提出的碱性电泳技术更加优越, 用溴化乙

锭 (EB) 染色能显示遇碱不稳定位点和明显断裂. 每个受损细胞在电泳时, 其 DNA 从核中向阳极伸展, 形成一个亮的荧光头部和尾部, 形似彗星, 故又名彗星试验. 其尾长及尾荧光强度与受试物所致 DNA 断裂数目相关. 未受损细胞则呈一个圆形的头部, 无尾.

1 SCGE 试验程序

1.1 制片

a. 在 45℃ 下, 将 100 μ l 0.5% 正常熔点琼脂糖 (NMA) 的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 磷酸缓冲液 (PBS) 浇注到完全磨砂或磨粗的 Dakin 载玻片上, 迅速盖上 1 号盖玻片, 置 4℃ 10 min 使琼脂糖固化. 第一层主要是为了使第二层和第三层平整和附着紧密.

b. 在 37℃ 下, 将约 1000 个悬于 10 μ l PBS 中的受检细胞与 75 μ l 0.5% 低熔点琼脂糖 (LMA) 相混.

c. 轻轻移开盖玻片, 迅速将细胞悬液滴到第一层琼脂糖上, 盖上盖玻片让其均匀铺开, 置 4℃ 10 min 使琼脂糖固化.

d. 在 37℃ 下, 移开盖玻片, 将 75 μ l 0.5%

¹⁾ 卫生部武汉生物制品研究所, 武汉 430060.

²⁾ 湖北职工医学院, 荆沙 434000.

收稿日期: 1994-11-29, 修回日期: 1995-03-25

LMA 作为第三层加上, 置 4℃ 固化.

e. 移开盖玻片, 将载玻片浸入新配制的 4℃ 冷溶解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH10, 1% 肌氨酸钠, 用前加 1% Triton X-100, 10% DMSO) 中至少 1 h 或过夜, 但长时间溶解可能会导致缓冲液沉淀.

f. 将载玻片取出, 晾干, 并列置于水平凝胶电泳槽中阳极端, 电泳槽中盛新配制电泳缓冲液 (1 mmol/L Na₂EDTA 和 300 mmol/L NaOH), 约覆过载玻片 0.25 cm, 在高 pH 电泳缓冲液中放置 20 min 以便 DNA 在电泳前解螺旋.

g. 在室温下, 调整槽中缓冲液面高低在 300 mA, 置 25 V 电泳 20 min.

h. 电泳后, 将载片置染缸, 用 pH7.5, 0.4 mol/L Tris 浸洗三次, 每次 15 min.

i. 呈中性后, 将载片用 50~100 μl 2 mg/L EB 水溶液染色, 再盖上盖玻片.

以上所有步骤应在黄、红色灯光下或暗处进行, 以免 DNA 额外破坏. EB 染色剂可置 4℃ 暗处保存数日.

1.2 分析

EB 染色后的样品应尽快在荧光显微镜下观察, 用目镜测微尺测定, 或拍摄 ×400 黑白显微照片再作测定. 每个样品中至少随机挑选 25 个细胞测定, 测核 DNA 直径和移出的 DNA (即彗星尾) 长度、彗星面积. 有条件者可借助图象分析仪作大规模分析.

2 样品处理方案

2.1 单细胞悬液的制备

SCGE 试验只需少量样品细胞, 因此可用于测定任何类型细胞的 DNA 断裂, 其单细胞悬液可从单层培养或各种组织尸检中获得. 一般采用刮 (scraping) 或机械解聚 (mechanical disaggregation) 获得细胞, 作悬浮培养或在磨砂玻片上进行单层培养, 经原位受试物处理 (即染毒) 后直接进行 SCGE 分析^[10]. 目前已应用过的细胞有原代肝细胞、鼻粘膜细胞、淋巴

细胞、原代大鼠细胞等.

2.2 染毒方案

在体外试验中, 可直接将受试物加入到生长培养基中, 也可对包埋于琼脂糖中的细胞进行染毒. 染毒后可直接检测 DNA 损伤, 也可以在 37℃ 下培养一段时间, 以检测 DNA 修复情况. 但值得注意的是, 在 37℃ 下, 在标准琼脂糖中培养对照组淋巴细胞 1 h, 也可能导致彗星形成. 在体内试验中, 可经某一途径给动物以受试物, 在短时间 (1~72 h) 后, 取出细胞, 检测其生活力, 立即进行 SCGE 检测. 这种方法已经用于毒物动力学研究, 如吸入毒物后采集呼吸道细胞, 食入毒物后采集消化道细胞.

3 影响 SCGE 分析的因素

3.1 受试物、DNA 损伤与修复

有些受试物, 如 ⁶⁰Co、γ 射线或 H₂O₂ 在接触的早期直接引起 DNA 断裂, 并且大多数在 15 min 内得到修复; 而有些受试物, 如 UV, 则多在照射后 1 h 引起 DNA 断裂达最高峰^[11]. 在修复方面, 各种细胞中也有差异. 如 SCGE 可揭示肿瘤细胞 PECA4197 与 MeWo 对放射损伤的差异不是源于损伤, 而是肿瘤细胞 PECA4197 的修复比 MeWo 快得多^[12].

3.2 细胞周期

一般认为, 细胞处于不同周期对 SCGE 的敏感性有影响, 无论在中性或碱性 SCGE 中都是如此. 如 S 相细胞 DNA 比其他相 DNA 表现的损伤轻, 这可能是由于 DNA 结构差异, 复制时的 DNA 在电场中迁移变慢所致, 另外可能还有其他因素影响断裂的 DNA 从胞核中迁移出^[13,14].

4 SCGE 结果分析

在 SCGE 中, 未受损细胞表现为一圆形荧光核心, 即彗星头部, 无尾. 而受损细胞则有彗星尾从核中伸向阳极, 形成一个亮的荧光头部和尾部. 有人认为其尾长与 SSB 数目相关^[9], 但当剂量加大时, 尾中荧光强度更能反应断裂频数^[2]. Olive 等^[15]报道, 断裂 DNA 数目

变化4倍时,其尾长仅变化21%,而尾中荧光强度几乎增加一倍。尽管如此,人们仍认为低剂量通常更重要。Vijayalaxmi等^[6]认为DNA损伤程度直接与辐射剂量、碱接触时间、电泳长度有关,因此将尾长作指标具有一定的价值。分析方法主要是对显微负片进行测量,如彗星长度、头直径、面积。也可测其斜度(skewness)和峭度(kurtosis),以辨别不同受试物,如UV、X线、博莱霉素等可引起不同的彗星形状,还可用自动数字图象处理系统,它能提供全范围密度及几何参数,描述彗星整体和头尾各部的特征。在统计时由于它不属于正态和单模型分布,故不宜用参数或非参数检验,而应用响应或非响应混合评价(即用Lehman转换打分方法),因它是强行设定界线值,将结果分为阴性或阳性。如果要得到剂量-反应关系,不宜用彗星长度,而最好用面积或尾部荧光强度作判断。

5 SCGE 机理探讨

SCGE与碱性解螺旋等多种技术有着相似之处,后者是将解螺旋率作为SSB频数指标,然而它们又截然不同,因为在中性环境中,SCGE仍然有效。

在通常情况下,DNA双链以组蛋白为核心盘旋形成核小体,在核小体中DNA为负超螺旋结构,如果有去污剂进入细胞,核蛋白被浓盐提取,DNA便形成残留的类核,如果类核中DNA断裂,就会在核外形成一个DNA晕轮,DNA断裂将引起超螺旋松散,电泳时DNA断片向阳极伸展,形成特征性彗星尾,这时彗星尾可能还与头部有次序的结构以单链相连。因此,决定断裂DNA电泳行为的关键因素是DNA超螺旋的释放。DNA受损越严重,含断裂片段越多,在彗星尾中出现的DNA就越多。尾中DNA百分含量和尾长就成了DNA断裂的重要定量参数^[15,16]。

6 SCGE 应用前景

SCGE已被用于检测受试物对哺乳类细胞DNA损伤和修复的各种体内外试

验^[8~10,12,14,15,17~19],其检测DNA断裂的特性使它广泛地用于各种理化因素诱导的DNA损伤与修复的研究;作为生物标记进行生物监测及流行病学研究;遗传毒理学研究;肿瘤治疗方案的研究。

彗星试验在DNA切除修复研究中尤其有用,而切除修复在人类DNA损伤修复中占主要地位,利用它可进行从损伤到切除修复、合成、连接的单步骤各时点的观察;同时,除完整细胞外,它可用于渗透性细胞的研究,因后者的核对外来蛋白、抑制物、脱氧核苷酸等渗透,可用于DNA修复的分子机理探讨^[2]。Green等^[11]报道,SCGE可能是干皮病(XP)快速诊断的好方法,并可在修复缺陷型细胞中研究DNA的损伤与修复。

在流行病学研究中,人们越来越重视生物学标记,血红蛋白和DNA加合物、DNA损伤(碱性和中性凝胶洗脱)和人类淋巴细胞遗传学(染色体畸变分析、微核试验、SCE)都已被用作生物学标记^[20]。可是,DNA加合物的检测不能提供DNA损伤在各种细胞的分布^[21];所用到的生化方法不能提供单个细胞中DNA损伤情况;细胞遗传学方法不能用于单个细胞水平,且往往限于增殖细胞,尤其是外周淋巴细胞^[22]。而SCGE技术则超越了这些方面,而且相对简便、快速,对各种理化因素都较敏感,需样品量少(10~20 μ l血样即可),适合于各种细胞类型的体内外检测,花费少,因此非常适合于接触遗传性有害因素人群的生物监测,并可用于筛检对DNA损伤因素敏感的高危人群。值得注意的是,有人报道用淋巴细胞做的SCGE可能会存在个体内和个体间差异,其他非淋巴细胞则变异很小^[23]。SCGE试验不囿于人类细胞,它还适用于环境污染物对接触鱼类DNA损伤的监测。

SCGE是一种评价遗传毒性损害非常敏感的系统,可在组织培养及悬浮培养的原代细胞中进行DNA损伤诱导,且在体内及离体均可检测,以探讨已知遗传毒物和致突变物的特异活性,包括体外细胞特异代谢活化和DNA修复,

体内相关途径给予化合物的代谢动力学和剂量-反应关系, 以及某些未知化合物的遗传毒性.

在肿瘤治疗中有一个重要问题, 那就是肿瘤细胞和正常细胞对理化治疗所致 DNA 损伤的修复能力, 如果肿瘤细胞的修复能力强, 则意味着治疗的失败; 如果正常细胞的修复能力低, 则增大了治疗的危险性, 治疗方案的制定一直是医学家的难题^[12]. 在 SCGE 技术出现之前, 一直没有较好的方法来确定低剂量治疗时细胞个体的修复能力. SCGE 的出现使人们得到了一个有效的评价方法^[15,16]. 它可以检测 2 Gy 以下照射时细胞的损伤与修复, 并被认为是低剂量辐射 (0.05 Gy) 时快速灵敏的检测方法^[6]. SCGE 还可用于治疗药物的筛选及疗效观察^[16].

参 考 文 献

- 1 Ahnstrom G. *Int J Radiat Biol*, 1988; **54**: 697
- 2 Gedik C M, Ewen S W B, Collins A R. *Int J-Radiat Biol*, 1992; **62**: 313
- 3 Arlett C F, Lowe J E, Harcourt S A *et al.* *Cancer Res*, 1993; **53**: 609
- 4 Betti C, Davini T, Giannessi L *et al.* *Mutat Res*, 1994; **307** (1): 323
- 5 Kennelly J C, Lane M P, Backer J A *et al.* *Carcinogenesis*, 1993; **14** (4): 637
- 6 Vijayalaxmi, Tice R R, Strauss G H *et al.* *Mutat Res*, 1992; **271**: 243
- 7 Hanawalt P C, Friedberg E C, Fox C F *et al.* *DNA repair mechanisms*. New York: Academic Press, 1978: 465 ~ 468
- 8 Ostling O, Johanson K J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; **123**: 291
- 9 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* *Exptl Cell Res*, 1988; **175**: 184
- 10 Singh N P, Tice R R, Stephen R E *et al.* *Mutat Res*, 1991; **252**: 289
- 11 Green M H L, Lowe J E, Harcourt S A *et al.* *Mutat Res*, 1992; **273**: 137
- 12 Muller W U, Bauch T, Streffer C *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1994; **65** (3): 315
- 13 Olive P L, Wlodek D, Durard R E *et al.* *Exptl Cell Res*, 1992; **198**: 259
- 14 Olive P L, Banath J P. *Mutat Res*, 1993; **294** (3): 275
- 15 Olive P L, Banath J P, Durard R E. *Int J Radiat Biol*, 1993; **64** (4): 349
- 16 Olive P L, Vikse C M, Durand R E. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994; **29** (3): 487
- 17 Ward A J, Olive P L, Burr A H *et al.* *Mutat Res*, 1993; **294** (3): 299
- 18 Anderson D, Yu T W, Philips B J *et al.* *Mutat Res*, 1994; **307** (1): 261
- 19 Olive P L, Banath J P, MacPhail H S *et al.* *Cancer Res*, 1994; **54** (14): 3939
- 20 Delaney C A, Green M H, Lowe J E *et al.* *FEBS Lett*, 1993; **333** (3): 291
- 21 Perera F P. *Mutat Res*, 1988; **205**: 255
- 22 Doerjer G U, Bucholz U, Kreuzer K *et al.* *Int Arch Occup Environ Health*, 1988; **60**: 169
- 23 Liegibel U M, Schmezer P, Pool-Zobel B L. *Mutagenesis*, 1992; **7**: 162

Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A DNA Breakage Detection Technique. Qin Chunhua, Shen Jianying, Huang Shine, Wang Guangzu (*Institute of Industrial Toxicology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*).

Abstract The single cell gel electrophoresis (SCGE), also called comet assay, is a simple, sensitive, rapid and inexpensive detection technique of DNA breakage in individual mammalian cell. It has been used in both *in vivo* and *in vitro* studies to assess DNA damage and repair induced by various agents, such as physical factors, e. g. UV, radiation, chemical factors, e. g. oxidants, trichloroethylene, acrylamide, bleomycin, as well as ageing and smoking, in a variety of mammalian cell lines. A panorama of the development of the SCGE assay, the mechanism and the procedures of the method, and its potential applications in DNA damage and repair, biomonitoring, cancer therapy researches, etc. is given.

Key words DNA breakage, single cell gel electrophoresis, DNA damage, DNA repair, tumor therapy, comet assay