

用病毒探针研究紫外线诱导的 DNA 损伤的致死效应

苏兆众 罗祖玉

(复旦大学生物系生物物理组, 上海)

胡蓓华

(上海财经学院经济信息系)

紫外线 (254nm) 能诱导一系列 DNA 损伤。嘧啶二聚体是至今所知的主要损伤产物^[1]。然而, 由于细胞基因组结构和复制方式的复杂性以及 DNA 损伤修复途径的多样性, 定量地研究特定 DNA 损伤的生物学效应是困难的。微小病毒是一种良好的探针, 因它们有特有的基因组结构和复制方式, 它们已被成功地用于探测细胞的诱发性易错修复功能和突变过程^[1,5,13]。在此项研究中, 自主性微小病毒 MVM (Minute Virus of Mouse) 被用做探针。它的基因组由一个含有五千多个核苷酸的单链线状 DNA 分子组成, 其复制过程包括通过延伸 3' 端自我引物把单链亲代 DNA 变成双链的复制形

式、加倍复制形式和合成子链等三个步骤^[6]。如果在亲代单链上存在复制阻遏性损伤, DNA 复制过程就无法完成。我们用不同剂量的紫外线照射 MVM, 作出受损病毒的存活曲线; 分析了在一定辐射剂量下含胸腺嘧啶的二聚体的形成率, 再换算成一定辐射剂量下嘧啶二聚体的形成率, 比较遗传与生化实验结果, 可以说明嘧啶二聚体的形成是受照射病毒失活的主要原因。

一、材料与方 法

1. 细胞及其培养条件 小鼠 L 细胞系 A9 细胞株^[7] 单层贴壁生长于塑料培养皿中, 用含

理 2 天后的 SGC-7901 细胞所进行的 FCM 分析表明, G₁ 期的细胞比例增加, S 期的细胞比例减少 (图 2); 在丁酸钠 (3mM) 抑制的可逆性实验中观察到, 在换入正常培养液后 28 及 33 小时, SGC-7901 细胞的有丝分裂指数达到最高峰, 这说明丁酸钠阻断细胞于 G₂ 期。薛绍白等使用丁酸钠阻断 HeLa 细胞于 G₁ 早期, 其他一些作者使用 Friend 细胞、CHO 细胞以及 HTC 细胞也得出类似结果。丁酸钠似能特异地阻断细胞于 G₁ 期。有人提出丁酸钠和双丁酰 cAMP 对细胞均可产生某些类似效应, 但二者作用不尽相同。我们的实验结果支持后一观点。

参 考 文 献

[1] Rozenfurt, E. and Pardee, A. B.: *J. Cell Physiol.*

80, 273—280, 1972.

[2] O'Neill, J. P. et al.: *Exp. Cell Res.*, 97: 213—217, 1976.

[3] Knightbridge, A. and Ralph, R. K.: *Mol. Cell Biochem.*, 34, 153—164, 1981.

[4] Williams, G. M. *Cancer Letter*, 2, 237—246, 1977.

[5] Tayler-Papadimitriou, J.: *Int. J. Cancer*, 13, 404—411, 1974.

[6] Van Meeteren, A. et al.: *In Vitro*, 18, 891—899, 1982.

[7] Smets, L. A.: *Nature New Biol.*, 239, 123—124, 1972.

[8] Stambrook, P. J. and Velez, C.: *Exp. Cell Res.*, 99, 57—62, 1976.

[9] 王代树、赵孟莲: 《解剖学报》, 14, 87—92, 1983.

[10] Dean, P. N. et al.: *Cytometry*, 3, 188, 1982.

[11] Jastorff, B.: In 'Cell regulation by intracellular signals' (Edited by Stephane Swillens and Jacques E. Dumont), Plenum Press, New York, 1982.

[12] Küng, W. et al.: *Cell Biol. Int. Rep.*, 7, 345—351, 1983.

[本文于 1985 年 1 月 3 日收到]

10% 胎牛血清 (56℃ 灭活半小时) 的 Eagle 培养基培养。培养皿置于含 5% 二氧化碳饱和和水蒸气的培养箱中。

2. 病毒探针 病毒 MVM 的提纯基本上根据 Tattersall 等的方法^[8]。简言之,当被感染的 A9 细胞有 90% 出现病态时,在培养基中加入 ^3H 标记的胸苷 ($1\mu\text{Ci}/\text{ml}$, $40\text{Ci}/\text{mMol}$)。当细胞完全裂解时,收集细胞碎片,在 pH 8.7 缓冲液中反复冻融,把病毒颗粒从吸附状态释放出来; 800g 离心除去细胞碎片后,再用最终浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Micrococcus 核酸酶除去细胞核酸分子。最后,病毒用 $1.30\text{--}1.49\text{g}/\text{cm}^3$ 的 CsCl 密度梯度离心 (18kg, 20 小时) 分离。提纯后的病毒悬浮于 Tris-EDTA (pH 8.7) 缓冲液中,于 4℃ 保存备用。

3. 紫外线照射 辐射源是一个输出波长是 254nm 的灭菌紫外灯。用 Latarjet 剂量仪 (Curie 研究所) 标定剂量率。被照射的病毒悬浮液的厚度不超过 1 毫米。

4. 病毒感染 感染前病毒原液稀释于磷酸缓冲生理盐水 (PBS, pH 7.2) 中,每个长有单层细胞的直径为 6cm 的培养皿中加入 0.4ml 病毒稀释液, 37℃ 培养 1 小时,其间每隔 10 分钟摇晃培养皿一次,以保证细胞坪尽可能以均等的机会接触病毒。

5. 病毒空斑分析 病毒存活用空斑分析法确定,操作方法按文献 [9]: 直径为 6cm 的培养皿里接入 5×10^5 个细胞。次日用不同剂量紫外线照射的病毒感染细胞。感染后即含 0.64% 琼脂和 10% 胎牛血清的 Eagle 完全培养基覆盖细胞。6 天后,用中性红染色。细胞坪上未被染色的空斑即可用肉眼计数。空斑形成单位 (plaque-forming unit: PFU) 用来描写病毒的滴度。

6. 用双向纸层析法测定受照病毒 DNA 上含胸腺嘧啶的嘧啶二聚体 ($\text{T} \langle \rangle \text{T}$, $\text{T} \langle \rangle \text{C}$ 和 $\text{C} \langle \rangle \text{T}$), 操作基本上按 Carrier 的方法^[10]。 ^3H -胸腺嘧啶标记的 MVM 受紫外线照射后,用 10% 三氯乙酸沉淀大分子。再把包括 DNA 在内的大分子溶解在 90% 甲酸中,在 175℃ 水解

30 分钟,待甲酸蒸发后,水解产物溶解在微量水中制成样品。滴样于 Whatman 一号纸上,用溶剂 I (正丁醇: 水 = 86:14) 下行层析 15—20 小时。第一向层析基本上能把胸腺嘧啶单体与含胸腺嘧啶的二聚体分离。切出含有二聚体的部分,用溶剂 II (硫酸铵: 乙酸钠: 异戊醇: 水 = 40:9:1:50) 下行层析 4 小时。第二向层析进一步将混杂在二聚体里的胸腺嘧啶单体分离 (图 1)。用液闪分别测定胸腺嘧啶单体与含有胸腺嘧啶二聚体的量,用第二向层析得到的含胸腺嘧啶的二聚体的量除以两向层析得到的胸腺嘧啶单体量的和,就可得到一定辐照剂量下胸腺嘧啶形成二聚体的几率。

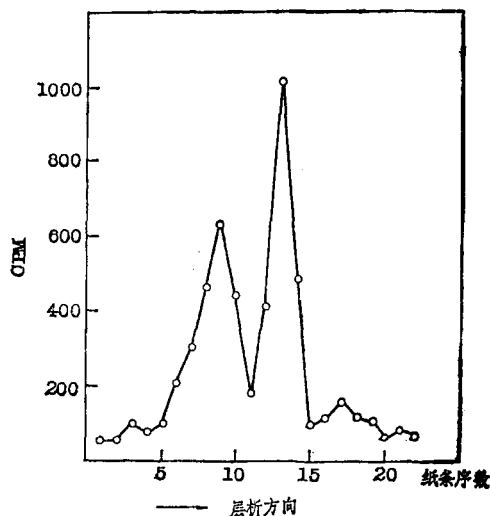


图 1 第二向层析中同位素标记量的分布

第二向层析完毕后,纸被切成 1cm 宽的小条,然后用液闪仪分别测量小纸条上的同位素量。图中第一个峰和第二个峰分别表示胸腺嘧啶单体和形成二聚体的胸腺嘧啶的同位素量

二、结果与讨论

1. 受紫外线照射的 MVM 的存活曲线 在半对数图表里, MVM 的存活率随着紫外线剂量的增加而线性地下降 (图 2)。图 2 的曲线可用下式描述:

$$S = \exp(-D/10)$$

式中 S 是病毒的存活率, D 是辐射剂量。由此可知,使 37% 病毒存活的剂量 (D_{37}) 是 10Jm^{-2} 。无肩的线性存活曲线说明: 1) 病毒基因组上

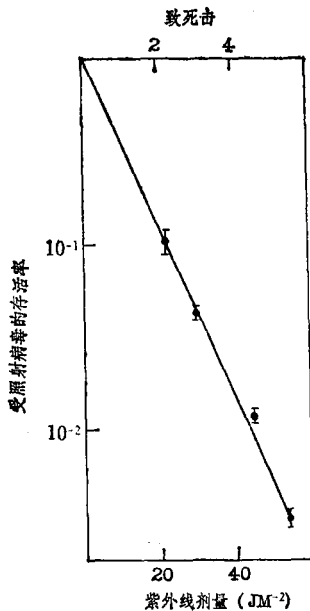


图2 受紫外线照射的 MVM 在 A9 细胞里的存活曲线

受照病毒存活率由受照病毒与同量的未照病毒形成的空斑数之比求得, 结果取自三次相互独立的实验, 垂直短线表示标准误。

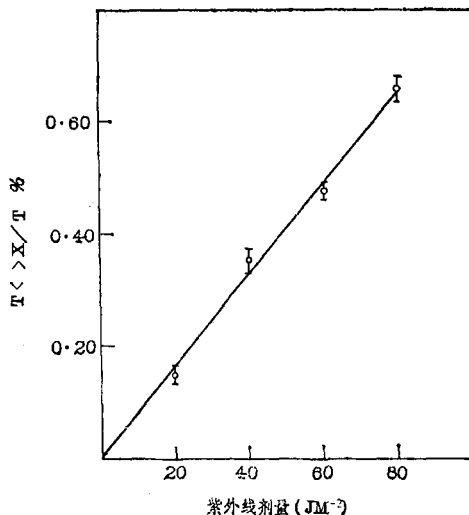


图3 在 MVM 基因组里紫外线 (254nm) 诱导的含胸腺嘧啶的二聚体的形成率

纵座标表示总的标记胸腺嘧啶中形成二聚体的百分比, 结果来自两个相互独立的实验, 垂直短线表示标准误

的一个紫外线损伤就可使病毒失活; 2) 宿主回复功能 (或细胞固有的 DNA 损伤修复功能) 不能修复病毒单链 DNA 上的紫外线损伤。

2. 病毒 DNA 上嘧啶二聚体的形成 用各种剂量的紫外线照射病毒, 可发现其基因组上含胸腺嘧啶二聚体的形成率随辐射剂量线性地增加 (图 3)。由曲线斜率可知, 胸腺嘧啶形成二聚体的几率是 $0.78 \times 10^{-4}/JM^{-2}$ 。通过简单的换算即可得出病毒基因组上嘧啶二聚体的形成率。

在变性的大肠杆菌 DNA 上各种嘧啶二聚体形成的比例是: $T\langle \rangle T: (T\langle \rangle C + C\langle \rangle T): C\langle \rangle C = 5:4:1^{[11]}$ 。根据 Kornberg 等的相邻碱基分析结果, 大肠杆菌 DNA 上两个相邻嘧啶的出现占整个嘧啶碱基数的比例是:

$$TT = 7.9\%; TC + CT = 11.4\%;$$

$$CC = 5.4\%^{[12]}$$

这样, 相邻嘧啶形成二聚体的几率是:

$$T\langle \rangle T: T\langle \rangle C(C\langle \rangle T):$$

$$C\langle \rangle C = 1:0.55:0.29$$

可以认为, 这个比例也适用病毒单链 DNA。

MVM 基因组上相邻嘧啶出现的比例是:

$$TT:(TC + CT):CC = 390:$$

$$490:202 = 1:1.260:0.519^{[6]}$$

那么病毒 DNA 上各种嘧啶形成的比例是:

$$T\langle \rangle T: T\langle \rangle C(C\langle \rangle T): C\langle \rangle C$$

$$= 1:0.693:0.151$$

已知 MVM DNA 共有 1679 个胸腺嘧啶^[6], 胸腺嘧啶形成二聚体的几率是 $0.78 \times 10^{-4}/JM^{-2}$, 由此即可求得受到单位剂量紫外线照射时病毒基因组上形成的嘧啶二聚体的总数 N 。

$$N = N_1(T\langle \rangle T) + N_2(T\langle \rangle C,$$

$$C\langle \rangle T) + N_3(C\langle \rangle C)$$

因为

$$2N_1 + N_2 = 1679 \times (0.78 \times 10^{-4})$$

$$N_1 = 0.0486$$

所以

$$N = 0.0486 \times (1 + 0.693 + 0.151) = 0.09$$

也就是说每受到 $1JM^{-2}$ 紫外线照射时, 在 MVM 基因组上平均可形成 0.09 个二聚体。

生化实验结果表明, 病毒基因组上嘧啶二聚体的形成与辐射剂量呈线性关系, 剂量为 $10JM^{-2}$ 的紫外线在病毒基因组上平均产生 0.9

参 考 文 献

- [1] Patrick, M. H. et al.: in *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids* (S. Y. Wang ed.), Academic Press, 2, 35, 1976.
- [2] Arlett, C. F. et al.: *Ann. Rev. Genet.*, 12, 95, 1978.
- [3] Setlow, R. B.: *Nature*, 271, 713, 1978.
- [4] Cornelis, J. J. et al.: *PNAS, USA* 78, 4480, 1981.
- [5] Su, Z. Z. et al.: *Carcinogenesis*, 2, 1039, 1981.
- [6] Astell, C. R. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 11, 999, 1983.
- [7] Littiefield, J. M.: *Nature*, 203, 1142, 1964.
- [8] Tattersall, P.: *J. Virology*, 20, 273, 1976.
- [9] Ledinko, N.: *Nature*, 214, 1346, 1967.
- [10] Carrier, W. L.: in *DNA Repair* (F. C. Friedberg and P. C. Hanawalt eds.), 1, Marcel Dekker, Inc. New York, 3, 1981.
- [11] Setlow, R. B.: *J. Mol. Biol.*, 17, 234, 1966.
- [12] Josse, J.: *J. Biol. Chem.*, 236, 864, 1961.
- [13] Rommelaere, J.: *Nucleic Acid Res.*, 10, 2577, 1982.
- [14] Kornberg, A.: *DNA Replication* (Published by W. H. Freeman), New York, 608, 1980.
- [15] Painter, R. B.: in P. C Hanawalt et al eds. *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, Plenum, 595, 1976.
- [16] Moore, P. et al.: *Nature*, 278, 664, 1979.
- [17] Vos, J.M. et al.: *Biochimie*, 64, 839, 1982.
- [18] Patrick, M. H.: *Photochem. Photobiol.*, 25, 357, 1977.
- [19] Su, Z. Z. et al.: *Mutation Res.*, 149, 1, 1985.

[本文于 1985 年 2 月 25 日收到]

个嘧啶二聚体。遗传学的实验结果表明,同样剂量的紫外线能在病毒群体中形成一个致死击。这两个数字吻合较好,即病毒基因组上形成一个二聚体,就可使病毒失活。受照射病毒群体中的存活者是在基因组上规避了二聚体的形成的病毒颗粒。我们所得的结果与别人的实验证据是一致的: 1) 用生化方法分析在细胞内复制的受紫外线照射的 MVM, 可发现模板上的二聚体能有效地阻止亲代单链 DNA 变成双链的复制形式^[13]。二聚体的形成一般被称为“大型”DNA 损伤,因为它的形成严重地歪曲了 DNA 双螺旋结构^[14],因而形成对 DNA 复制的阻遏性作用^[15]。2) 用正常 DNA 复制酶系重建的体外复制系统显示了 DNA 合成被阻于二聚体处^[16]。

然而,这些实验结果并不排除在 DNA 复制过程中有少数二聚体被“容忍”的可能性。事实上,在 MVM/A9 细胞组成的实验系统中,已发现有百分之几的二聚体被细胞的复制复合物所“容忍”^[17]。此外,紫外线除了主要产生嘧啶二聚体外,还在 DNA 上诱发一系列非主要损伤,而且不能否定这些损伤的致死效应^[11]。事实上,本实验结果表明, MVM 失活至多有 90% 可归因于基因组上嘧啶二聚体的形成。

(上接第 80 页)

以这种注射器吸量液体,即便是浓硫酸(比重 1.8),手离开活塞杆时,杆的位置也不会自己滑动,操作十分方便。可根据需要用不同规格的医用注射器制成不同容积的此种注射器。

活塞杆也可按图 2b 由灯工吹制,在玻璃杆的凹陷处嵌入小段乳胶管作为活塞环,如此制得的 B 型注射器更精巧、更好用。

2. 连接管的制作

注射器与吸量管之间的连接管,要求其内径小、长度短。我们采用内径 0.8 mm 的聚氯乙烯管。该管的两端须各加一个接头,以便与注射器及吸量管连接。如有条件,接头可按图 3b 由工厂用橡胶或塑料制作。一般实验室可找内径尺寸适当的塑料管、硅胶管、乳胶管,各截取约 1 cm 长,把它们相互套接在一起,只要牢固、不漏气便可(图 3a)。

把制好的注射器、连接管与吸量管组装起来。用大小不同的注射器;和吸量管,可制成量程不同的配液

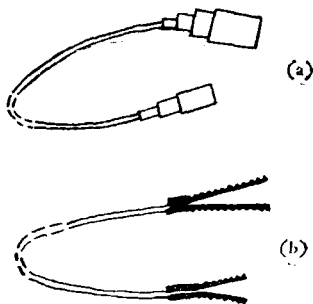


图 3 配液器连接管的示意图

器,故本装置的量程可从几十微升至几十毫升。

一般方法是让试样自吸管中自然流出,而本装置吸管中的试样是以一定速度推出。我们用双蒸水进行了测试,发现后一使用方式的误差较大,但在允许范围内。故已作过容积标定的吸量管,装入本装置使用时,无须重新标定。