

辐射后单个细胞 DNA 结构变化的定量检测*

罗 瑛 孙志贤 杨瑞彪 张振声

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 细胞照射后可产生 DNA 链断裂、DNA-DNA 交联、DNA-蛋白质交联等重要的 DNA 结构损伤, 最终可导致 DNA 高级结构——DNA 超螺旋结构状态的改变, 而引发 DNA 复制、表达等一系列改变。参考国外报导, 建立了单细胞电泳法(single cell gel electrophoresis assay), 并辅以图象分析技术, 可快速检测低至 0.1Gy 剂量所致 DNA 结构损伤, 并得到了较好的剂量-效应关系, 可望成为生物剂量计, 用于环境低剂量辐射的监测。

关键词 DNA 结构损伤, 单细胞电泳, 图象分析, 低剂量辐射

辐射所致 DNA 损伤的检测方法很多^[1], 按使用的 DNA 材料可分为两类, 一类是以裸 DNA (naked DNA) 为材料进行检测的方法, 即通过去污剂处理和蛋白水解等方法去除细胞中与 DNA 结合的绝大部分物质后, 得到的 DNA 用于检测; 另一类则以拟核(nucleoid)为材料, 即用高盐、去污剂等处理细胞, 去除核膜和部分核蛋白, 而所得的 DNA 仍保持适当缠绕的环区(loop), 附着在剩余的核骨架(nuclear skeleton)上, 保持了一定的 DNA 超螺旋结构, 有利于研究损伤对 DNA 高级结构的影响。

单细胞电泳法属于后一类, 由于其细胞电泳形状颇似彗星, 又称彗星法(comet assay)。它不仅检测损伤所致 DNA 链断裂, 同时也可检测链断裂引起的 DNA 高级结构的变化。值得强调的是, 该法以单个细胞为观察对象, 有别于以细胞群体为检测对象的方法, 可检出同种细胞中 DNA 损伤程度不同的亚群, 有利于研究细胞间 DNA 损伤、修复能力的差异, 也大大拓宽了其应用范围。

本实验室参考国外报导^[2,3], 建立了灵敏、快速的单细胞电泳方法, 照后 4—8h 可得出结果, 辅以图象分析技术可定量检出 0.1Gy 照射细胞的 DNA 结构变化。

1 材料与方法

1.1 人外周血淋巴细胞的分离纯化

取健康献血员外周血抗凝, 经生理盐水等倍稀释后, 用 Percoll 梯度分离出淋巴细胞, 具体方法参见文献 [4]。收集淋巴细胞层, 离心洗涤后悬浮于 10mmol/L PBS 溶液中, 台盼蓝染色表明细胞存活率 >95%。

1.2 细胞照射

将上述细胞冰浴照射, 剂量率为 13.39 rad/min, 照射剂量分别达到 0.1Gy, 0.25Gy, 0.5Gy, 1Gy, 2Gy。照后细胞立即进行单细胞电泳。

1.3 单细胞电泳

1.3.1 胶板的制备 取 1ml 0.5% 普通琼脂糖铺于载玻片上, 盖上盖玻片压平胶面, 4℃ 冷凝 10min 后, 揭去盖玻片。取 37℃ 水浴中的 1% 低熔点琼脂糖 35μl 与等量细胞悬液混匀, 立即铺于上述载玻片上, 盖上盖玻片压平胶面, 4℃ 冷凝 10min 后, 再在上面铺一层 0.5% 低熔点琼脂糖, 4℃ 冷凝 10min。

1.3.2 细胞裂解和电泳 将制好的胶板浸没于细胞裂解液 (2mol/L NaCl, 100mmol/L

*国家自然科学基金 (39130050) 部分资助。

收稿日期: 1993-08-21, 修回日期: 1993-10-25

EDTA- Na_2 , 1% N-月桂酰肌氨酸钠盐, 10mmol/L Tris, pH10.0, 用前加入1% Triton X-100), 置于4℃, 裂解1h. 取出胶板置于装有电泳缓冲液(300mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA- Na_2)的水平电泳槽中, 静置20min使损伤中的碱不稳定位点(base-labile sites)充分暴露, 4℃电泳20min(电源为Bio-Rad model 250/2.5, 25V, 300mA).

1.3.3 中和与染色 电泳完毕后, 将胶板浸没于中和液(0.4mol/L Tris-HCl, pH7.5)中除去碱性电泳液, 15min后取出染色(碘化丙啶5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 暗处染色20min), 蒸馏水中脱色15min.

1.4 观察和拍照

在荧光显微镜下观察细胞电泳图象, 绿光激发, 吸收滤片590nm, 目镜10 $\times$, 物镜20 $\times$, 乐凯高速黑白卷(ASA400)拍摄.

1.5 图象分析

使用Quantimet 970图象分析系统测定单细胞电泳图象. 选择适当的图象灰度域值以便区分单细胞的头与尾, 高于域值的部分即为头部, 其余部分则为尾部. 分析了细胞头部面积及积分光密度、尾部面积及积分光密度、尾长, 计算了尾部面积/总面积和尾部光密度/总光密度两个比值. 实践表明, 后者更能恰当地反映DNA结构的变化程度.

2 结 果

2.1 Comet 图象

由于射线使DNA产生链断裂, 继而引起

高级结构松散. 在电场的作用下, 松散的DNA会离开细胞核向正极泳动, 形成拖尾, 拖尾程度与DNA损伤程度正相关(图1b—d). 对照组细胞DNA未受损伤, 致密的结构阻止DNA从核内泳动出来, 因此几乎没有拖尾, 只有一个明亮的头部(图1a).

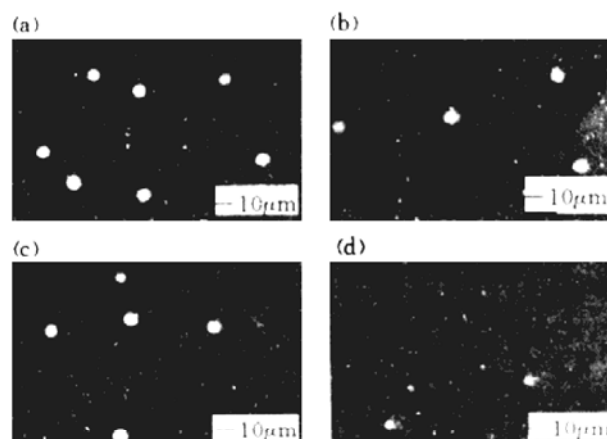


图1 淋巴细胞电泳图象

(a) 对照组 (b) 照射0.1Gy组 (c) 照射0.25Gy组 (d) 照射1Gy组.

2.2 图象分析

图象分析数据及统计处理(方差分析)结果见表1. 由此可见, 1Gy组与2Gy组差别无显著性, 说明剂量增大到一定程度后, 剂量-效应关系曲线将变得平缓.

2.3 剂量-效应关系

以尾部光密度所占比率对照射剂量作图, 得到良好的剂量-效应关系曲线(图2). 当照射剂量>1Gy时, 曲线转平.

表1 尾部积分光密度比值及方差分析

照射剂量/Gy	0	0.1	0.25	0.5	1	2
尾部积分光密度/总积分光密度(均值)	0.1229	0.2085	0.3628	0.6683	0.8421	0.8580
组内数据方差	0.0044	0.0030	0.0038	0.0024	0.0026	0.001
相邻组差异显著性		$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$

注: 表中每个剂量点的数据来源于对约30个原始数据的分析, P 值由两两 F 检验算出.

3 讨 论

单细胞电泳法检测照后单个细胞的DNA

结构变化, 是近年来兴起的一项新技术, 该法简便、快速, 灵敏度高, 所需细胞量少(1—10 $\times 10^4$ 个/ml), 可对单个细胞的变化进行测量.

如果辅以图象分析、计算机处理,则可达到定量化,有希望成为生物剂量计,对环境中低剂量辐射或其它以基因为靶的毒性因子进行监测。

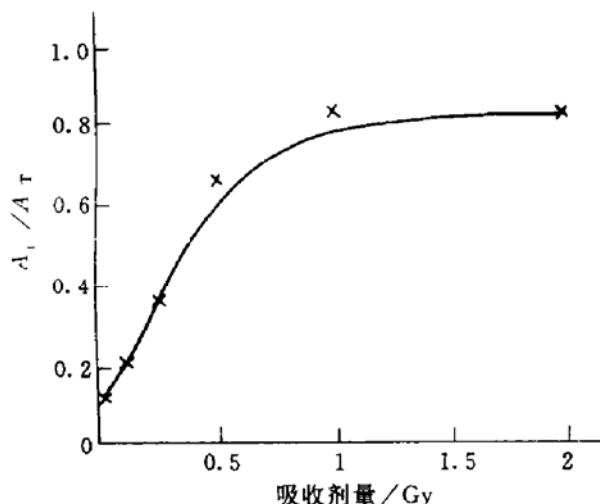


图2 剂量-效应关系曲线

A_t : 尾部积分光密度值; A_T : 总积分光密度值。(相关系数=0.84255)。

另外,在恶性肿瘤的放疗、化疗中,抗性细胞亚群的存在常常是肿瘤复发的根源。由于本法可检测出单个细胞的变化,可望用于肿瘤抗性细胞亚群的检出,为放疗、化疗效果评估

及预后提供科学依据^[5]。

本实验以人外周血淋巴细胞为研究材料,取材方便,利于临床应用。但由于体细胞的细胞间异质性较大,需进行大量细胞分析才能得到较稳定的结果,使用培养细胞则可得到重复性较好的结果(未发表)也说明了这一点。因此,如果推广应用到临床,正常细胞置信限的测定、取材的进一步优化等大量工作尚待进行。

本实验是针对低剂量损伤的检出而设计的,在较大剂量照射时,剂量-效应曲线可能转为平直,采用加大胶浓度、缩短电泳时间等措施可降低本法的检测灵敏度,提高检测剂量。

参 考 文 献

- 1 Whitaker S J, Powell S N, Mcmillan T J. *Eur J Cancer*, 1991; 27: 922
- 2 Singh N P, Tice R R, Stephens R E *et al.* *Mutat Res*, 1991; 252: 289
- 3 Sutherland B M. *DNA damage and repair in human tissues*. New York: Plenum, 1990; 291
- 4 Gutierrez C, Bernabe R R, Vega J *et al.* *J Immuno Meth*, 1979; 29: 57
- 5 Tice R R, Strauss G H S, Peters W P. *Mutat Res*, 1992; 271: 101

一种改进的纯化和鉴定牛脑皮层 G_s 蛋白的方法

范高峰 黄有国

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 用1%胆酸钠和15%饱和硫酸铵相结合的方法,从牛脑皮层细胞膜中抽提得到主要含激活型 G_s -蛋白(G_s)和腺苷酸环化酶(AC)两种蛋白组分的制剂,然后通过 Sepharose 6B 柱将两者分开。将含 G_s 高活力的级分用庚胺-Sepharose 4B 柱进一步分离,即可获得高活力的 G_s , SDS-PAGE 显示为分子量 45 000 和 36 000 的两条蛋白带。该法具有简便、快速、重复性好、产率高等优点,且可同时获得无 G_s 污染的 AC。用无 G_s 污染的 AC 脂酶体测定 G_s 活力亦简便、可靠、灵敏度高。

关键词 激活型 G_s -蛋白(G_s), 腺苷酸环化酶(AC), 牛脑

G -蛋白(GTP-binding protein)介导的信号跨膜传递体系是由细胞膜上受体、 G -蛋白和效应器如腺苷酸环化酶(AC), 磷脂酶 C 和离

子通道等组成,体系中各组分在信号跨膜传递

ethanol. The sample was applied on the column and equilibrated with pH4.0 acetic acid buffer. Then pH5.2 of different concentration acetic acid buffers were used for elution of MT. Two eluted peaks were obtained and identified as MT-2 and MT-1. Comparing with the traditional method—gel filtration and ion exchange chromatography, this method is simple and time-saving in laboratory-scale.

Key words metallothionein, metal chelating, isolation and purification

Quantitative Analysis of DNA Structure Changes in Individual Irradiated Cells. Luo Ying, Sun Zhixian, Yang Ruibiao, Zhang Zhensheng. (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 451—453

Irradiated cells express DNA structural damages, such as DNA double-strand break, DNA-DNA crosslink and DNA-protein crosslink etc. These damages result to changes of DNA supercoil state, which trigger a series changes of DNA replication and expression. Many methods to test DNA damages have been established, roughly can be divided into two kinds according to the DNA materials used. The first use the naked DNA extracted from cells and free from DNA-binding materials existed in cell. The second one uses nucleoid for research, here the detergents and hypertonic salt buffers were used to remove nuclear envelope and a part of nuclear proteins, nuclear DNA remains appropriate tangled loop and binds to residual nuclearskeleton. This DNA structure is beneficial to research damage effects on DNA structure, single cell gel electrophoresis belongs to the latter. It also named comet assay because its

cell electrophoresis shape looks like a comet. It can test not only DNA stand break but also measure DNA structure changes resulted from stand break. According to oversea reports, with slight modification, single cell gel electrophoresis assay has been established. Employing image analysis system, fast quantitative measurement of DNA structure changes of single cell irradiated as low as 0.1Gy can be given with a well correlated dose-responses relationship. After further study, the method might be developed as a kind of biodosimeter for application of monitoring environmental low level irradiation.

Key words DNA structure damages, single cell gel electrophoresis, image analysis, low dose irradiation

A Modified Method for Purification and Identification of G_s from Bovine Brain Cortex. Fan Gaofeng, Huang Youguo. (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994, **21** (5): 453—456, 469

Soluble proteins mainly containing G_s (stimulatory GTP-binding protein) and adenylate cyclase (AC) from cell membranes of bovine brain cortex were extracted with 1% sodium cholate and 15% saturated ammonium sulfate. Separation of G_s and AC was carried out by Sepharose 6B gel filtration. Purified G_s can be obtained by passing the fractions containing G_s from Sepharose 6B column through a heptylamine Sepharose 4B hydrophobic column. The purity of G_s was identified by its highly stimulated activity to AC and SDS PAGE which showed two bands of 45kD and 36kD. The procedure described above is characterized by simplicity, rapidity, repeatability and high