

and γ -globin gene promoter regions of 4 previously identified mutants were amplified by nested PCR, then the mutations were detected by CCM, and the optimal condition was determined. It was proved that CCM is a simple and reliable molecular diagnostic

method for the detection of γ -globin point mutations.

Key words chemical cleavage of mismatch, point mutation detection, γ -globin gene, hereditary persistence of fetal hemoglobin

细胞氧化损伤时 8-羟基鸟嘌呤的测定*

张海涛 祝其锋

(广东医学院医用生化研究所, 湛江 524023)

莫丽儿 庄海旗

(广东医学院化学教研室, 湛江 524023)

蔡 春

(广东医学院中心实验室, 湛江 524023)

摘要 利用 H_2O_2 易通过细胞膜而到达核这一特点, 初步探讨了不同浓度 H_2O_2 对 HL-60 细胞 DNA 的氧化损伤程度. 发现 H_2O_2 浓度在 0.4 mmol/L 以上时, 作用 8~24 h 可以用气相色谱/火焰离子检测器 (GC/FID) 检测到氧化损伤标志产物——8-羟基鸟嘌呤 (8-oh-G), 并观测到在 0.4~0.8 mmol/L H_2O_2 作用一定时间时, 8-羟基鸟嘌呤含量随 H_2O_2 浓度升高而升高.

关键词 HL-60 细胞, 8-羟基鸟嘌呤, H_2O_2 , 气相色谱/火焰离子检测器

学科分类号 Q27

许多资料显示自由基和许多人类的疾病有着密切关系. 自由基影响着细胞的代谢过程, 在衰老、肿瘤的发生、心血管疾病等中起着重要作用^[1]. 自由基的生成可以是内源性的, 如氧化酶系统的反应; 也可以是外源的, 如具氧化还原作用的药物、电离辐射过程等. 无论是内源性的, 还是外源性的自由基产生过程, 都能造成 DNA 的氧化损伤. 因而自由基是造成突变的一个重要因素, 它在癌变过程中起着促进作用^[2,3]. 在体内许多自由基毒性是由于 O_2^- 、 H_2O_2 和过渡金属离子产生的高活性 $\cdot OH$ 造成的^[1]. H_2O_2 作为小分子物质, 极易通过细胞膜到达核内, 和核酸某些特异位点的金属离子反应产生高活性的 $\cdot OH$, 造成 DNA 的氧化损伤: DNA 链的断裂和交联^[4,5], DNA 碱基的修饰^[6,7]. 其中 8-羟基鸟嘌呤是重要的 DNA 氧化损伤产物之一, 利用 GC/FID 的高效分离能力, 可检测到一定量的 8-羟基鸟嘌呤.

1 材料与仪器

1.1 试剂

双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA)、乙腈为 Fluka 公司产品; 菲为 BDH 产品; 蛋白酶 K、RNA 酶 A、甲酸为 Sigma 公司产品; RPMI

1640 完全培养基为 LIFE TECHN. 公司产品; 小牛血清为杭州四季青公司; 过氧化氢、苯酚、氯仿均为国产分析纯试剂.

1.2 仪器

衍生瓶: 本课题组设计, 中国科学院上海有机化学研究所加工, 进口隔垫封口; 美国 Varian SP-3400 型气相色谱仪, 3 m × 0.25 mm × 0.3 μm 交联 SE-54 覆盖开管熔融石英毛细管柱, 载气为高纯氮气, FID 检测器, 台式自动平衡记录仪; 日本岛津 GC-17A/QP-5000 型气质联用仪, 美国 J&W 公司 DB-5 毛细管柱 (25 m × 0.32 mm × 0.3 μm), 载气为高纯氦气, 电离方式为 EI, NISI 谱库; LGJ 型真空冷冻干燥机; 电热式真空恒温干燥箱, PE. Lambda 2S 型紫外/可见光谱仪.

2 实验方法

2.1 细胞培养

HL-60 细胞株 (军事医学科学院赠); 用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 完全培养基将生长状况良好的细胞调整至 5.0×10^5 /ml, 培养液体积为 40 ml. 分别按下列处理: A 组加入过氧化氢溶液,

* 广东省重点学科资助课题, 粤高教科 [1997] 14 号.

收稿日期: 1998-02-24, 修回日期: 1998-07-06

使之终浓度为 0.4 mmol/L, 37 °C, 5% CO₂ 培养 2、4、8、24h; B 组加入过氧化氢溶液, 使之终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L, 37 °C, 5% CO₂ 培养 8 h. 1 000 g 离心 5 min, 收集细胞, 用 pH 7.2, 0.01 mol/L PBS 洗 2 次.

2.2 DNA 的提取和鉴定

将搜集的细胞加入 100 mg/L 的蛋白酶 K 溶液 2 ml, 37 °C 水浴 24 h, 加入等体积的苯酚, 轻摇 10 min, 5 000 g 离心 5 min, 将水层取出, 重复一次. 加入等体积的氯仿/异戊醇溶液 (24/1), 轻摇 10 min, 5 000 g 离心 5 min, 将水层取出, 4 °C 透析, 直到透析液于 270 nm 处吸光值小于 0.05, 加核糖核酸酶 A 溶液, 使之浓度为 50 mg/L, 37 °C 水浴 12 h, 加入 100 mg/L 的蛋白酶 K 溶液 1 ml, 重复氯仿-苯酚法纯化 DNA. 将提取的 DNA 稀释 10 倍, 200~400 nm 波长扫描, 定性, 定量^[8].

2.3 DNA 水解, 衍生

取上述 DNA 溶液 300 μl, 加到衍生瓶内, 真空干燥 5 h. 加 98% 甲酸 300 μl, 150 °C 水解 1 h. 真空干燥 8 h. 加 BSTFA 150 μl, 150 °C 衍生 1 h. 自然冷却, 过夜.

2.4 气相色谱检测

色谱条件: 氮气线性流速 30 ml/min, 氢气线性流速 30 ml/min, 空气线性流速 300 ml/min, 进样量 0.8 μl, 分流比 15:1, 一阶升温程序 120 °C (1 min) → 15 °C/min 升温 → 260 °C (9 min), 进样口温度为 300 °C, FID 温度 310 °C, 衰减 8, 量程 11.

2.5 气质联用仪鉴定

升温程序: 同气相色谱检测, 进样量 0.1~0.2 μl, 分流比 10:1, 质谱轰击电压: 70 eV, 质量扫描范围 30~600 amu^[9].

3 结 果

3.1 GC/FID 检测结果与 CGC/MS SIM 鉴定

图 1 为气相色谱图谱, 箭头所指为 8-羟基鸟嘌呤峰 (图 1a), 保留时间为 15.80 min, 图 1b 示 15.00 min 后已无可见峰出现.

图 2 为气相色谱/质谱仪-选择性离子探测器 (CGC/MS-SIM) 图: 图 2a 为总离子图, 箭头所指为 8-羟基鸟嘌呤处. 图 2b 为 SIM 的结果, 表明有 440, 455 (*m/z*) 出现, 证明有 8-羟基鸟嘌呤存在. 图 2c 则为质谱图, 73 (*m/z*) 为硅烷基的特征峰, 440, 455 (*m/z*) 为 8-羟基鸟嘌呤经 70 eV 轰击后产生的特征碎片.

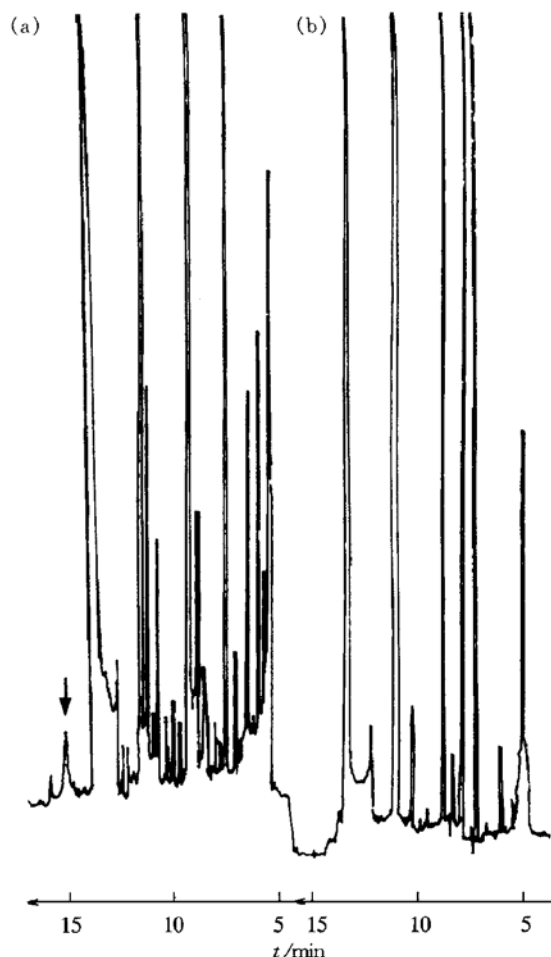


图 1 GC/FID 检测图

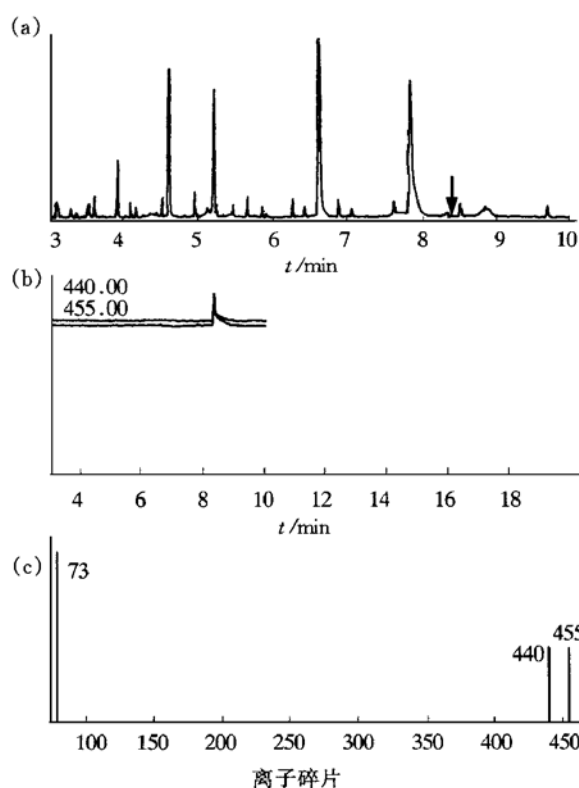


图 2 CGC/MS SIM 鉴定图

3.2 作用时间对 8-羟基鸟嘌呤水平的影响

H_2O_2 作用不同时间的结果表明, 细胞经 0.4 mmol/L H_2O_2 持续 8h 的作用就可检测到 DNA 中有 8-羟基鸟嘌呤. 此时镜观细胞时, 可见有较多的细胞死亡. H_2O_2 作用 24 h 时, 细胞完全死亡, 8-羟基鸟嘌呤含量是作用 8 h 的 3 倍有余 (图 3). 显然 H_2O_2 持续作用的时间长短影响 8-羟基鸟嘌呤的产量. 相反, H_2O_2 作用 4 h, GC/FID 检测不到 8-羟基鸟嘌呤, 用 CGC/MS-SIM 也证实无典型的 440, 455 (m/z) 峰出现. 说明该条件下测不到 8-羟基鸟嘌呤. 镜观细胞状态, 仅有少数细胞出现死亡.

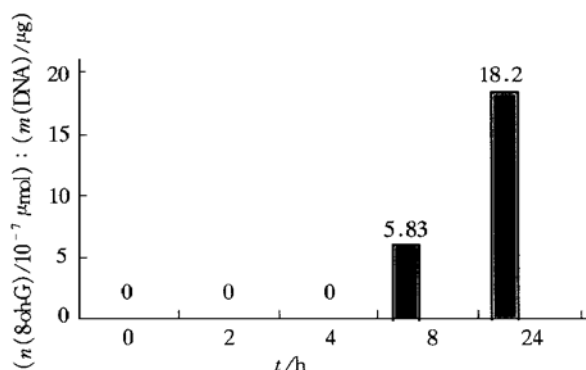


图 3 不同时间处理 8-羟基鸟嘌呤含量变化图

3.3 不同浓度 H_2O_2 作用时 8-羟基鸟嘌呤含量变化

用不同浓度的 H_2O_2 处理细胞的结果显示, 在 H_2O_2 浓度达到 0.4 mmol/L 以上时用 GC/FID 可以检测到 8-羟基鸟嘌呤 (图 4), 而在低于 0.4 mmol/L 时, 检测不到 8-羟基鸟嘌呤. 镜下观察细胞状态时发现, 当低于 0.2 mmol/L 的 H_2O_2 作用后, 对细胞影响不大, 仅出现少数死亡细胞, 而在 0.4 mmol/L 以上的 H_2O_2 作用细胞时可发现有大量的细胞死亡.

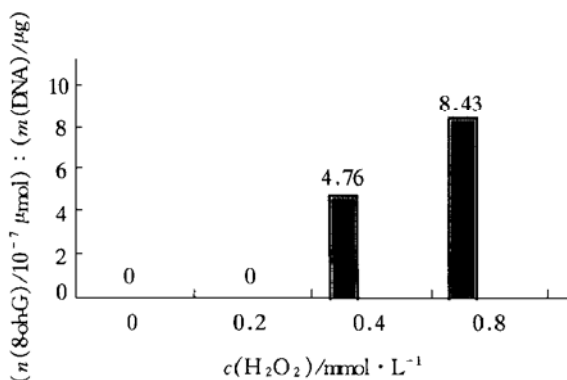


图 4 不同浓度过氧化氢对 8-羟基鸟嘌呤含量的影响图

4 讨 论

H_2O_2 作用于细胞时, H_2O_2 因其分子质量小, 可以穿越细胞膜到达核内, 与过渡金属离子发生 Fenton 类型反应, 产生高活性的羟自由基, 这些高活性的羟自由基不仅造成 DNA 的断裂, 而且可氧化修饰正常的碱基, 生成各种修饰碱基. 这些所涉及的过渡金属离子也许结合在染色质的某些部位, 也许是因氧化应激造成这些金属离子从存储部位释放^[10]. 有研究表明, 在体内 H_2O_2 产生的羟自由基的反应中, 金属离子起着重要作用. 目前研究认为单独的 H_2O_2 不能造成 DNA 的修饰碱基的产生^[11].

DNA 氧化损伤产物现已发现 20 种之多, 其中 8-羟基鸟嘌呤是一种重要的、具有生物学意义的氧化修饰碱基, 它是鸟嘌呤 8 位碳原子被氧化而形成的, 该碱基的化学性质比较稳定, 目前被认为是一种反映 DNA 氧化损伤的较灵敏与稳定的指标^[12, 13]. 体内与体外实验也证明该碱基和突变、肿瘤的发生有着一定的联系. 利用 GC/FID 可以有效地将 8-羟基鸟嘌呤和其他成分分离, 并可以对其进行定量, 不失为研究 DNA 氧化损伤的灵敏可靠的检测方法.

参 考 文 献

- Halliwell B, Cuttidge JM C. The importance of free radicals and catalytic metal ion in human disease. *Mol Aspects Med*, 1985, **8** (1): 89~ 193
- Brawn M K, Fridovich I. Increased superoxide radical production evokes inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1985, **260** (2): 922~ 925
- Cerutti P A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985, **227** (4685): 375~ 381
- Sagripanti J L, Kraemer K H. Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1989, **264** (3): 1729~ 1734
- Yamamoto K, Kawanishi S. Hydroxyl free radical is nit the main active species in site-specific DNA damage induced by copper (II) ion and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1989, **264** (26): 15435~ 15440
- Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B, *et al.* Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **285** (2): 317~ 324
- Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao B C, *et al.* Chemical nature of *in vivo* DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **285** (2): 388~ 390
- 蔡良琬主编. 核酸研究技术. 北京: 科学出版社 (Cai L W. *Nucleic Acids Research Technology*. Beijing: Sciences Press), 1987. 3~ 5
- Dizdaroglu M, Halliwell B, *et al.* Application of Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry to Chemical Characterization

- of Radiation Induced Base Damage of DNA: Implication DNA Repair Processes. *Anal Biochem*, 1985, **144** (2): 593~ 603
- 10 Halliwall B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J*, 1987, **1**: 358~ 364
- 11 Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z, *et al.* Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, 1990, **29**: 7876~ 7882
- 12 Guyton K Z, Kensler T W. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull*, 1993, **49** (3): 523~ 544
- 13 Floy R A. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1990, **11** (9): 1447~ 1550

Detection of 8-hydroxyguanine in Hydrogen Peroxide-damaged HL-60 Cells DNA. ZHANG Hai-Tao, ZHU Qi-Feng (*Institute of Medical Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*); MO Li-Er, ZHUANG Hai-Qi (*Department of Chemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*); Cai Chun (*The Central Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*).

Abstract Although hydrogen peroxide is generated in cells by normal metabolism, the reaction of the stress or by treatment of the cells with 0.4 mmol/L of hydrogen peroxide for 8~ 24 hours can result in DNA damage. 8-hydroxyguanine is a typical hydroxyl radical-induced products in DNA. The yields of the 8-hydroxyguanine in DNA isolated from H₂O₂-treated HL-60 cells in different ways were reported. The 8-hydroxyguanine in the cells treated in more than 0.4 mmol/L H₂O₂ for eight hours. In order to identify the 8-hydroxyguanine, the result was confirmed by CGC/MS-SIM. The results suggested that the nuclear DNA damage in cells caused by H₂O₂ may be involved in formation of hydroxyl radicals.

Key words human promyelocytic leukemia, 8-hydroxyguanine, H₂O₂, gas chromatography/flame ion detector

内皮型氧化氮合酶 FAD 间区在大肠杆菌中的表达^{*}

赵建华

沈月 朱敏生¹⁾ 许祥裕 潘英

(江苏省肿瘤防治研究所, 江苏省临床检验中心, 南京 210009)

(南京军事医学研究所防护室, 南京 210002)

摘要 为了研究内皮型氧化氮合酶 (eNOS) 的功能、功能调节以及结构与功能的关系, 通过 PCR 技术克隆出 eNOSFAD 间区 801~ 902AA 肽段的编码基因, 插入 pET-28a (+) 表达质粒中构建成 pET-28a/eNOS₂ 重组表达质粒, 经转染在大肠杆菌中成功表达。表达蛋白经金属离子螯合亲和层析和 SDS-PAGE 回收纯化, 得蛋白质纯品。为 eNOS 特异性抑制肽的筛选和 eNOS 特异性抗体的制备提供了必要的准备。

关键词 eNOS, 重组表达, 大肠杆菌

学科分类号 Q55, Q78

一氧化氮 (NO) 具有第二信使物质、神经递质和细胞毒性等多重功能, 广泛参与机体生理、病理生理功能的调节。其化学性质极不稳定、半衰期短, 功能的发挥主要依赖于氧化氮合酶 (NOS) 的生物合成。目前, 已被纯化或克隆的 NOS 大致分为三种类型: 脑型 (nNOS)、内皮型 (eNOS) 和诱导型 (iNOS)。它们均以 L-Arg 为底物, 在 FAD、FMN、NADPH 和 BH₄ 等辅助因子协同下, 催化合成 NO; 同时, 它们的活性也可受 L-Arg 衍生物的抑制^[1]。

eNOS 属原生酶, 主要分布在内皮细胞^[2]; 与其他 NOS 同源性比较发现: eNOS 存在两个同源

性较低的区域即 N 端 1~ 134AA 区 (简称 e₁) 和 801~ 902AA 区 (简称 e₂)。e₂ 正好处于 FAD-P 与 FAD-I 之间, 很可能与 FAD 电子传递功能密切相关; 同时 e₂ 又是 eNOS 第二种读框结构中唯一低同源性区域, 非常独特。为此, 我们选择性对 e₂ 进行了表达。表达蛋白一方面可作为目标蛋白, 通过噬菌体展示随机肽库筛选该区的结合肽, 若该肽的结合可阻断 FAD 电子传递, 即得到 eNOS 特异

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39670856) 和 95 全军医药卫生科研基金。

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1999-01-18, 修回日期: 1999-03-06