

用人外周血线粒体 DNA 4977bp 缺失检测

辐射损伤初探

封江彬¹ 陆雪¹ 陈德清¹ 陈晓穗² 刘青杰¹

¹ (中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 北京 100088)

² (海军总医院 北京 100037)

摘要 初步探索用聚合酶链反应(PCR)方法进行辐射诱导的线粒体 DNA 4977bp 缺失分析的可行性。对正常人外周血进行 2Gy ^{60}Co γ 射线的照射,照射后提取包含线粒体 DNA 的全基因组 DNA,用 PCR 方法进行线粒体 DNA 4977bp 缺失分析,同时扩增很少缺失的线粒体 DNA 片段(16S-ND1);进而比较照射前后线粒体 DNA 4977bp 缺失水平。结果表明,用于分析线粒体 DNA 4977bp 缺失的引物对在最佳试验条件下,可特异性扩增出所有 2Gy 照射诱导的线粒体 DNA 4977bp 缺失;该扩增产物经纯化、测序和核苷酸同源性分析,证实线粒体缺失发生在线粒体 DNA 序列的 8470-13446bp。用于扩增 16S-ND1 的引物对在很大的温度变动范围内,均能扩增出目的 DNA 片段。所有外周血样品在照射前无线粒体 DNA 4977bp 缺失,2Gy ^{60}Co γ 射线照射后特异诱导出此缺失。说明用本研究中建立的 PCR 方法,可用来分析电离辐射诱导的外周血有核细胞线粒体 DNA 4977bp 缺失水平。

关键词 ^{60}Co γ 射线,线粒体 DNA 常见缺失,PCR 扩增

中图分类号 R811.5, Q691.5, Q751

人类线粒体 DNA (mtDNA) 独立于细胞核基因组外,是人类细胞中唯一的核外遗传物质,其全部核苷酸序列 16569bp 已经清楚^[1]。线粒体 DNA 具有进化速率快、群体内变异大、分子结构简单及严格的母系遗传等特点。研究认为线粒体 DNA 突变与人类的衰老、进化、神经退行性病变、糖尿病和恶性肿瘤等有关^[2-4]。因此,线粒体基因组已成为当今学者们的研究热点。

线粒体 DNA 呈裸露状态,缺少组蛋白和非组蛋白对 DNA 的作用,因此线粒体 DNA 对辐射等氧化损伤较敏感,且其损伤修复能力低,可造成核酸片段的缺失、碱基修饰以及插入突变等,其中以 mtDNA 4977bp 缺失最为常见(Common deletion)。该缺失位于 mtDNA 序列的 13bp 的正向重复序列(5'-ACCTCCCTCACC-3'),即 8470-8482 和 13447-13459 之间^[5]。有研究表明,辐射可特异性诱导此缺失的产生^[6],表明 mtDNA 4977bp 缺失可能是辐射损伤的标志之一,因此有必要对此进行研究。

本研究目的就是初步探索用普通 PCR 方法分析 ^{60}Co γ 射线诱导的人外周血有核细胞线粒体 DNA 4977bp 缺失,建立用 mtDNA 4977bp 缺失为指标检测电离辐射损伤的方法。

1 实验材料和方法

1.1 外周血样品收集

选取年龄在 20—25 岁的健康男性 8 例,近期无 X 射线照射史,在知情同意的情况下收集静脉血 8mL,枸橼酸钠抗凝,平均分成 2 份。收集 1 例线粒体 DNA 4977bp 缺失阳性的 83 岁老年人外周静脉血 6mL。

1.2 外周血样品照射

由中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 SSDL 实验室提供的 ^{60}Co γ 射线治疗机,在室温下进行单次照射。源强 $1.3 \times 10^{14}\text{Bq}$,源至样品的垂直距离为 80cm,照射野 $10\text{cm} \times 10\text{cm}$;吸收剂量率为 61.34cGy/min ,剂量误差为 $\pm 1.5\%$,剂量为 0 和 2Gy。照射后的血样直接进行总 DNA (包括基因组 DNA 和线粒体 DNA) 的提取。

1.3 外周血样品中有核细胞总 DNA 的提取和定量

用盐析法进行有核细胞总 DNA 提取(内含基因组 DNA 和 mtDNA)。静脉血各 2mL 中加入预冷

国家人事部留学回国人员择优资助项目(2002 年 优秀类)

第一作者:封江彬,女,1963 年 11 月出生,1991 年毕业于北京职工医学院医学检验专业,主管技师,放射生物学专业

收稿日期:初稿 2004-04-30,修回 2004-06-28

的 ddH₂O 12mL 混匀, 冰中放置 5min, 3000r/min 离心 20min; 弃上清后加入预冷的 0.9% NaCl 溶液 12mL, 混匀, 3000 r/min 离心 20min; 弃上清, 每管中加入 2mL 细胞裂解液 (50mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA pH 8.0), 打碎沉淀后各加入 10% SDS 100 μ L, 混匀, 再加入 20mg/mL 蛋白酶 K 25 μ L, 置 37°C 过夜消化。次日取出血样, 每管中加入 6 mol/L NaCl 0.7mL, 剧烈振荡 20s, 3000 r/min 离心 20min, 将上清移至另一离心管中, 各加入无水乙醇 5mL, 反复颠倒直至出现 DNA 絮状沉淀, 挑出 DNA 沉淀

置 1.5mL eppendorf 管中, 用 70%乙醇洗 2 次, 加 1 $\times$ TE 溶解 DNA, 用紫外分光光度计测定 OD 值进行定量。溶解的 DNA 样品在 -20°C 保存。

1.4 PCR 扩增

用于扩增 mtDNA 的引物见表 1。引物对 P3-P4 扩增 mtDNA 很少缺失区 16S-ND1 区, 引物对 P1-P2 扩增缺失型 mtDNA。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

Table 1 The primers used in the PCR analysis of mtDNA 4977bp deletion

Primers	Sequence of primer	Size of PCR product
P1(7901—7920)	5' -TGAACCTACGAGTAGACCGA-3'	862 bp
P2(13750—13731)	5' -GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'	
P3(3628—3648)	5' -CCTCTAGCCTAGCCGTTTAC-3'	433bp
P4(4044—4061)	5' -GGGAGAGTGCGTCATA-3'	

1.5 以 P1 和 P2 为引物的 PCR 条件摸索

1.5.1 PCR 反应体系 所有 PCR 反应在梯度 PCR 仪 (Eppendorf AG 22331, Hamburg) 上进行。在 50 μ L 的 PCR 反应体系包括: 外周血总 DNA 300ng、dNTPs 200 μ mol/L、引物浓度为 3.0—50 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 2.5 U、加 ddH₂O 至 50 μ L, 在 PCR 仪上进行扩增反应。扩增条件: 94°C 变性 4min, 退火温度分别为 51—53°C 50s, 72°C 延伸 30s, 共 20—35 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。扩增产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳 (Mupid-2, Mini-gel electrophoresis system, Advanced 公司, 日本), 100V、30min。凝胶在数字图像分析系统上观察, 照片。参照 1kb DNA 标准确定产物 DNA 片段的大小和产量。

1.5.2 退火温度 退火温度选择的温度范围为 53.0、53.1、53.3、53.6、54.1、54.6、55.2、55.7、56.2、56.7、57.0、57.2°C, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳来判断确定最佳退火温度。最佳退火温度为 55.7°C。

1.5.3 引物浓度 引物浓度在 3.0、6.25、12.5、25、50 μ mol/L 范围内选择, 判断结果同退火温度的确定。最佳引物浓度为 12.5 μ mol/L。

1.5.4 循环次数 PCR 循环次数在 20、25、30、35 中选择, 判断结果同退火温度的确定。确定 PCR 循环次数为 30 个。

1.5.5 P3-P4 引物对的 PCR 产物 对 P3-P4 引物对来说, 主要用来确定在 P1-P2 引物对在 51—55°C 范

围内变动的扩增结果和 DNA 模板质量。P3-P4 引物分别用 12.5 μ mol/L。

1.6 以 P1-P2、P3-P4 引物对同时进行 PCR

将 P3-P4 引物对稀释到 3 μ mol/L, P1-P2 引物对浓度提高到 50 μ mol/L, 在 P1-P2 最适退火温度条件下进行双重 PCR。并对照射前后样品的 mtDNA 4977bp 缺失水平进行比较。

1.7 线粒体 DNA 缺失 PCR 产物测序

引物对 P1-P2 按标准 PCR 体系扩增测序模板 50 μ L, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 经溴化乙锭 (终浓度为 0.5 μ g) 染色, 用紫外反射仪观察产物片段大小, 将待测片段从凝胶上切下, 经凝胶纯化后送国家人类基因组北方研究中心测序 (ABI 3700 毛细管测序仪)。DNA 序列经核苷酸序列同源性分析 (BLAST), 并与 NCBI 标准 mtDNA 序列进行对比。

2 结果

2.1 P1-P2 引物对 PCR 条件的优化

经过反复摸索, P1-P2 引物对进行 PCR 的最佳试验条件为: 退火温度为 55.7°C、引物浓度为 12.5 μ mol/L、循环次数为 30 个。从图 1 中可以看出: 经 2Gy 照射后的 8 例样品和阳性标本一样, PCR 扩增的产物在 800—900bp 之间。

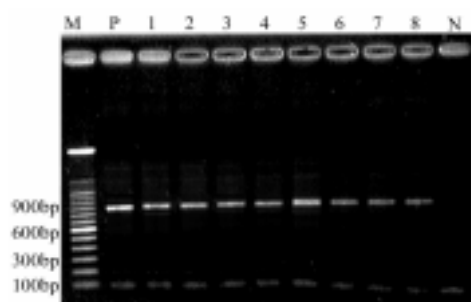


Fig.1 The PCR products of peripheral blood total DNA exposed to 2Gy ^{60}Co γ -rays with P1-P2 primer pair. M. 1kb DNA ladder, P. Positive control, N. Negative control, 1-8. Samples had been exposed to 2Gy γ -rays

2.2 内对照引物对 (P3-P4) 的扩增结果

我们同时设计引物对 P3-P4, 扩增 mtDNA 一般不会缺失的区域 16S-ND1, 目的是验证提取的总 DNA 中 mtDNA 的质量, 并作为模板中 mtDNA 总量的定量。扩增的结果是在多个温度下均能扩出 433bp 片段, 表明模板质量良好 (见图 2)。

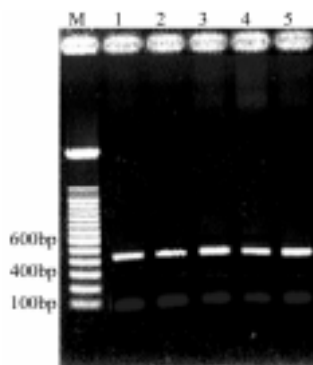


Fig.2 The PCR products of peripheral blood total DNA with P3-P4 primer pair. M. 1kb DNA ladder, 1-5. PCR products of blood total DNA samples were irradiated to 2Gy by γ -rays and annealed at 51-55°C

2.3 各个样品在照射前后的比较

通过用双重 PCR 同时扩增照射前后外周血有核细胞线粒体 DNA 4977bp 缺失和很少缺失的 DNA 片段 16S-ND1, 从图 3 中可看出: 照射前的样品只扩出 16S-ND1 的 433bp 片段, 照射 2Gy γ 射线的样品可同时扩出 433bp 和 862bp 片段。

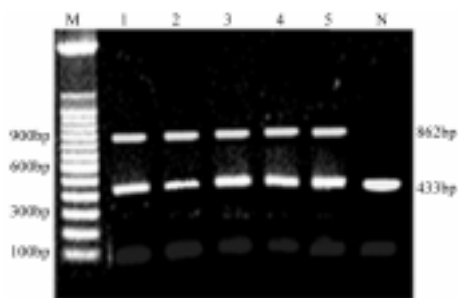


Fig.3 The PCR products of peripheral blood total DNA before and after exposed to 2Gy ^{60}Co γ -rays. M. 1kb DNA ladder, 1-5. Samples were exposed to 2Gy γ -rays radiation, N, the sample without the γ -rays irradiation

3 讨论

越来越多的研究证明: 随着年龄的增加, 在许多组织中的线粒体 DNA 缺失增多。这些缺失的片段大小和位点是不同的, 只有线粒体 DNA 4977bp 缺失除外, 在 70 岁以上的老年人和线粒体疾病的所有组织中均可看到, 因此被称为常见缺失 (Common deletion)。本研究中用 2Gy ^{60}Co γ 射线的照射可诱导出外周血有核细胞线粒体 DNA 4977bp 缺失, 这就证实了 Kubota 等^[6]的研究结果, 辐射可诱导人类细胞的线粒体 DNA 4977bp 缺失。

目前认为, 线粒体 DNA 缺失的机制主要包括: 同源重组、拓扑异构酶分裂和滑行复制 (Slip-replication), 其中在老年医学中最广泛公认的是 mtDNA 在复制时滑行错配, 从而导致 mtDNA 4977bp 缺失的发生, 错配的关键位点在缺失两侧的正向重复序列。当 mtDNA 受到亲电子突变剂攻击时, mtDNA 环形链打开, 在延伸过程中这种正向重复序列可能发生错配。对于辐射诱导此缺失的发生, 可能为同源重组的机制, 因为在辐射造成的 DNA 双链断裂后, 修复率很低, 正向重复序列的错配, 造成了 mtDNA 4977bp 的缺失^[6]。

本实验中主要在缺失 DNA 片段两侧设计引物, 通过限制 PCR 反应条件, 未缺失的 mtDNA 不会产生 PCR 产物, 因为将近 6kb 的 DNA 片段不能被扩增; 而只有 4977bp 缺失的 mtDNA 才会产生 PCR 产物。为了验证提取的总 DNA 中 mtDNA 的质量, 同时设计扩增 16S-ND1 区域的引物。结果表明, 用盐析法提取 DNA 的质量是可以用于线粒体 DNA 缺失的分析, 用本研究中建立的 PCR 方法可以分析电离辐射诱导的 mtDNA 4977bp 缺失。

本研究只是对 ^{60}Co γ 射线照射诱导出的外周血有核细胞线粒体 DNA 4977bp 缺失进行分析, 结果只是初步的, 需要更多的研究证实。我们将对不同剂量水平的照射与 mtDNA 4977bp 缺失之间的关系进行详细探索。

最近的研究表明^[7,8], 用原位 PCR 和实时荧光定量 PCR 可以对 mtDNA 4977bp 缺失进行定量, 提示 mtDNA 4977bp 缺失有望用来进行放射事故生物剂量估算的指标, 但需要进一步的研究来证实。同时, 常用实验动物 (小鼠、大鼠、豚鼠) 均有与人类 4977bp 缺失类型相同的特定缺失^[9-11], 为线粒体 4977bp 缺失的研究提供了有力的动物模型研究工具。

参考文献

- 1 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Nature, 1981,

- 209(5806): 457-465
- 2 Chinnery P F, Samuels D C, Elson J, *et al.* Lancet, 2002, **360**(9342): 1323-1325
- 3 Miglore L, Coppede F. Mutat Res, 2002, **512**(2-3): 135- 153
- 4 Suzuki S, Oka Y, Kadowaki T, *et al.* Diabetes Res Clin Pract, 2003, **59**(3): 207-217
- 5 Von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech A P, *et al.* Forensic Sci Int, 2002, **126**(1): 34-39
- 6 Kubota N, Hayashi J I, Inada T, *et al.* Radiat Res, 1997, **148**(4): 395-398
- 7 Prasanna P G S, Hamel C J, Escalada N D, *et al.* Mil Med, 2002, **167**(Suppl. 1): 10-12
- 8 Mohamed S A, Wesch D, Blumenthal A, *et al.* Exp Gerontol, 2004, **39**(2): 181-188
- 9 Bayona-Bafaluy M P, Acin-Perez R, Mullikin J C, *et al.* Nucleic Acids Res, 2003, **31** (18): 5349-5355
- 10 D'Erchia A M, Gissi C, Pesole G, *et al.* Nature, 1996, **381** (6583): 597-600
- 11 Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, *et al.* J Mol Evol. 1989, **28** (6): 497-516

The primary study on radiation damage induced by ionizing radiation with human peripheral blood mitochondrial DNA common deletion analysis

FENG Jiangbin¹ LU Xue¹ CHEN Deqing¹ CHEN Xiaosui² LIU Qingjie¹

¹(National Institute for Radiation Protection, China CDC, Beijing 100088)

²(Chinese Naval General Hospital, Beijing 100037)

ABSTRACT This study is try to explore if the polymerase chain reaction (PCR) could be used to analyze the mitochondrial DNA 4977bp deletion (common deletion) induced by ionizing radiation. Peripheral blood samples were exposed to 2Gy ⁶⁰Co γ-rays in vitro, and genomic DNA, including mitochondrial DNA, was extracted. A PCR method was tried to analyze the common deletion, including seldom deleted 16S-ND1 gene. The common deletions before and after the 2Gy exposure were analyzed with the PCR method. The results showed that the common deletion PCR products were detected after exposure to 2Gy in each peripheral blood sample. The purified PCR products were sequenced and carried out BLAST on standard human mitochondrial genome sequence database. The result showed that the common deletion flanked between 8470bp and 13446bp. Before exposed to ⁶⁰Co γ-rays, no common deletion were not detected in the samples. These observations suggest that the PCR method, established in this study, could be used to detect the common deletion induced by ionizing radiation on peripheral lymphocytes samples.

KEYWORDS ⁶⁰Co γ-rays, Mitochondrial DNA common deletion, PCR amplification

CLC R811.5, Q691.5, Q751