

恒场电泳检测 DNA 双链断裂及其应用

李 雨 郑秀龙 罗成基⁽¹⁾ 蔡建明
孟祥顺 吴 玮 高建国

(第二军医大学放射医学研究所 上海 200433) ⁽¹⁾(第三军医大学防原教研室 重庆 630038)

摘要 应用普通恒场琼脂糖凝胶电泳检测受 γ 射线照射后小鼠胸腺细胞 DNA 双链断裂(dsb)。在一定条件下,该法可以获得与脉冲凝胶电泳相似的结果。用此法观察了离体照射小鼠胸腺细胞 DNA 修复作用,发现该法可以检测到 DNA“梯状”带,可做为一种研究细胞凋亡的新方法。

关键词 恒场琼脂糖凝胶电泳, γ 射线照射, DNA 双链断裂(dsb)

DNA 的损伤与修复是放射生物学的重要研究课题,尤其是电离辐射所致 DNA 双链断裂(dsb)是决定受照细胞命运的关键因素之一。早期建立的检测 dsb 方法灵敏度较低,操作条件不易控制(如中性膜洗脱法、速度沉降法等)^[1]。近年来国外普遍采用的脉冲电场凝胶电泳技术可以检测小于 10Gy 照射所致 dsb。但因其设备昂贵,国内难以普遍应用。本工作用改进的恒场琼脂糖凝胶电泳检测受 γ 射线照射的小鼠胸腺细胞 dsb,观察了受照射细胞的修复作用,获得了满意效果,还用此法检测出细胞凋亡具有的特殊 DNA 条带。

1 材料与 方法

1.1 制备胸腺细胞悬液

4 周龄雄性昆明种小鼠,由第二军医大学实验动物部提供。脱颈处死小鼠,取出整个胸腺置 200 目尼龙网,以注射器针芯加 PBS 研磨,制备单细胞悬液($2 \times 10^7/\text{ml}$)与 1% 低熔点琼脂按 1/3 (v/v)混合后注入制胶膜槽中,于 4℃ 冰箱中 10min 后取出,胶块体积 $0.2 \times 0.5 \times 0.65 \text{ cm}$,约含 5×10^5 个细胞。

1.2 照射处理

将制备好的细胞胶块置冰冷 PBS 中以不同剂量 γ 射线照射,剂量率为 0.38Gy/min。

1.3 修复实验

将不同剂量照射后的胶块置 37℃ 环境中温浴不同时间。

1.4 细胞 DNA 样品制备

将经过上述处理的细胞胶块置裂解液中(1%SDS, 0.025 mol EDTA, 0.01 mol Tris, 0.5mg/ml 蛋白酶 K, pH8.0)50℃ 24h,然后用 TE 缓冲液(1mmol EDTA, 10mmol Tris, pH8.0)洗 3 遍,置 4℃ 冰箱备用。

1.5 DNA 凝胶电泳

用 TBE 缓冲液(89mmol Tris, 89mmol 硼酸, 2mmol EDTA, pH8.0)制备 0.75% 琼脂糖凝胶($10 \times 7 \times 1 \text{ cm}$),内含 $0.5 \mu\text{g}$ EB。将制备好的含 DNA 胶块填入加养孔中,上端以少量融化的 0.75% 琼脂封固。电泳槽中加入 100 ml TBE 缓冲液,使用 BIO-RAD 2-200 型电泳仪,设置电压 10V,维持 17h。

1.6 DNA 图谱分析

将电泳分离的 DNA 胶块在紫外灯下照相,底片以 Mcrotec E6 型扫描仪分析 DNA 条带分布及灰度量值关系。

2 实验结果

图 1 是 0~50Gy γ 射线照射后小鼠胸腺细胞 DNAds b 变化。1(a)中相邻的两条带分别是每一剂量照射后滞留于加样孔中的原大分子 DNA 和电泳入胶的不同分子量的 DNAds b 片段。损伤越严重,DNA 片段越多(颜色越深)。1(b)为相应的光密度扫描图形;1(c)为 dsb 扫描积分面积与照射剂量的数值关系及模拟图。尽管从照片看 2Gy 照射后可出现 dsb 变化,但这种变化在 10Gy 才被仪器探知。随照射剂量增加,dsb 明显增加,在半对数坐标系中以峰下面积与照射剂量作图呈线性关系。

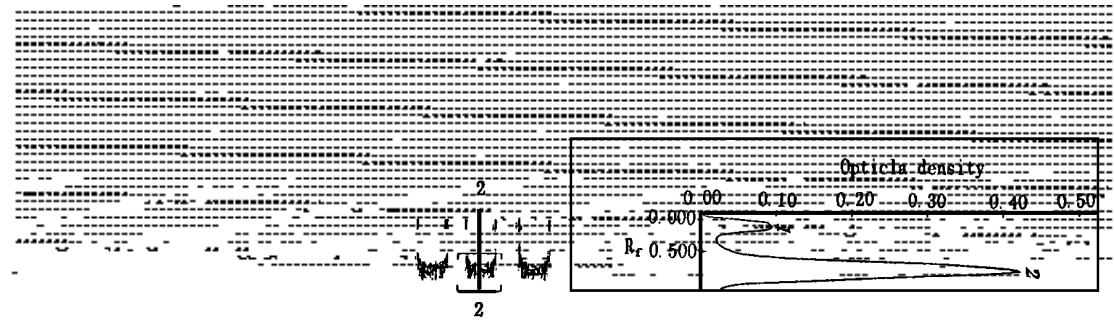


Fig. 1a Changes of DNAds b after 10~50 Gy γ irradiation (electrophoretic pattern). Band 1~6 are samples by 50, 40, 30, 20, 10, 0 Gy irradiation respectively

Fig. 1b Densitometer tracing pattern of the band 2 in the Fig. 1a peak 1 corresponds to the DNA remained in the sample wells of gel, peak 2 corresponds to the DNA migrated into the gel

图 2 显示 30Gy γ 射线照射小鼠胸腺细胞后 2h 修复时间内 dsb 的变化。随照后时间增加,进入凝胶的 DNAds b 逐渐减少,滞留于加样孔 DNA 含量逐渐增加,反映了受损 DNA 的修复过程。

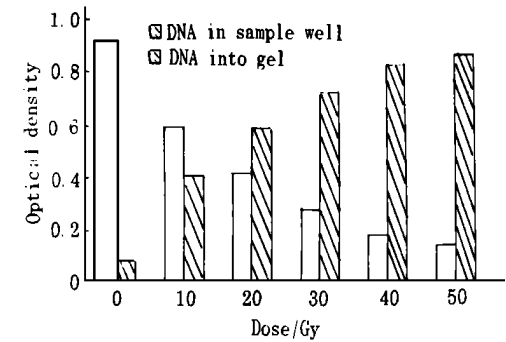


Fig. 1c The rate of DNA remained in the sample wells and migrated into the gel by different dose irradiation

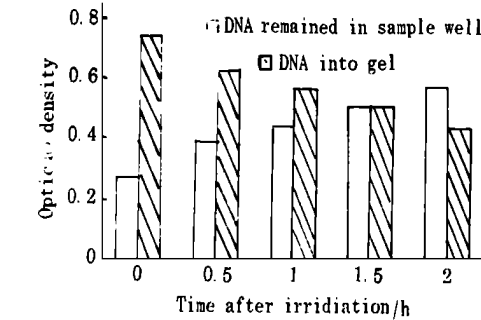


Fig. 2a DNA dsb repair in two hours after 30 Gy γ irradiation. Bands 1~5 are irradiated samples incubated in 37°C for 0~2 h, bands 6 is unirradiated control

图 3 为小鼠胸腺细胞受 5Gy 照射后 6h 内 dsb 检测结果。值得注意的是与上述 dsb 修复变化不同,出现了新的,呈条带状的 DNA 片段。

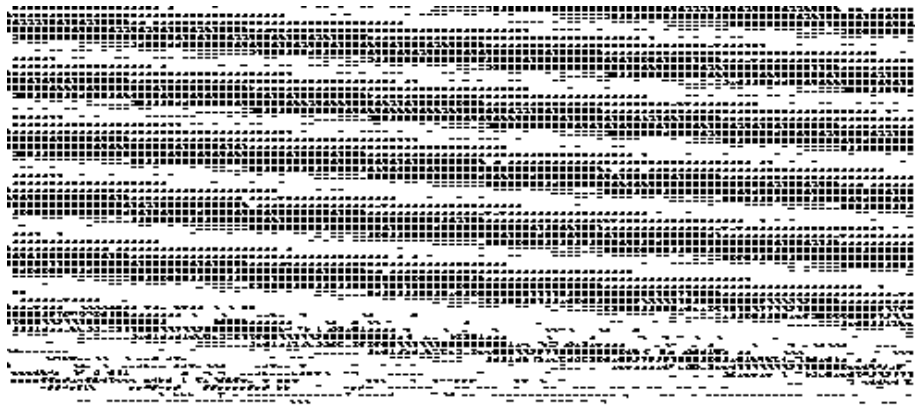


Fig.2b The rate of DNA remained in the sample wells and migrated into the gel after different incubation

Fig.3 The DNA ladder after 5 Gy γ irradiation. Band 1 was unirradiated control; bands 2~4 were irradiated by 5 Gy, then incubated in 37°C for 0, 4 h and 6 h respectively

3 讨论

脉冲电泳是近年发展的一种新的电泳装置,其原理是将 DNA 置交变的电场中使之“爬行”,以获得对大分子 DNA 的分离。用该法可探知 10Gy 以下辐射致 DNA 损伤,但因其设备昂贵,操作复杂,电泳时间较长,难以广泛应用。

琼脂糖凝胶电泳是分离、检测和纯化 DNA 片段的典型方法之一,在分子生物学领域得到广泛应用。电离辐射可造成大分子 DNA 发生 dsb 而生成 DNA 片段,如果选择适当条件,可使这种片段在电场移动,较大的 DNA 仍滞留于加样孔处,从而反映 DNA 损伤程度。由于哺乳类细胞 DNA 是非常大的线状分子,使用常规的乙醇沉淀法提取的 DNA 分子因其粘稠性和实验操作的剪切力作用,难以被完整移入加样孔中。用低熔点琼脂包裹细胞,虽经裂解,去蛋白,清洗等步骤,仍能使 DNA 较完整地保存于半固体胶块中,从而解决这一问题^[3]。

琼脂糖的浓度是影响 DNA 电泳的重要因素之一,它构成供 DNA 穿行的孔径,从而决定对线状 DNA 分子的有效分离范围。其浓度越小,可分离的 DNA 分子量越大,实验中也容易破碎。实验选用 0.75%琼脂糖,其有效分离范围是 0.8~10kb^[4]。另一影响 DNA 电泳的重要因素是电场强度,低电压时线状 DNA 片段的迁移率与电压成正比,随电压升高,不同分子量 DNA 片段的迁移率会以不同幅度增加,总 dsb 的分辨率下降。更重要的是高电压可使电泳缓冲液升温,甚至融化凝胶,故一般脉冲电泳要采用降温措施。采用 0.8V/cm 电场强度的工作电流<100 mA,可在常温下进行而无需降温。在较低的恒场电压中,一定大小范围内的 DNA 片段在琼脂糖凝胶中的迁移率几乎相等,所获得 DNA 入胶条带清晰,可进行定性、定量分析。

观察了 30Gy 照射后小鼠胸腺细胞 dsb 修复以说明该方法可行性。照射后经 37°C、0~2h 温育,使加样孔中 DNA 滞留量从 28.3%上升至 51.7%,说明随保温时间延长,孔内大分子 DNA 滞

留量增加,显示 DNAds_b 的修复过程,其变化趋势与以前观察的 DNAss_b 变化类似^[5]。

检测 5Gy 照射小鼠的胸腺细胞 dsb 修复情况时,发现新的小分子量 DNA 梯形条带,这是细胞凋亡的主要形态特征之一,其原因,性质和意义在进一步研究中。

以上说明,用恒场琼脂糖凝胶电泳不但能用来研究辐射所致离体细胞 DNAds_b 损伤效应,还能用来研究在体细胞的辐射损伤和修复作用,尤其是可以用来进行细胞凋亡研究,所需设备简单,操作方便,所用时间较短,检测结果类似脉冲电场凝胶电泳技术,是一种值得推荐的方法。

参 考 文 献

- 1 Radfort I R. Int J Radiat Biol, 1988, 54:1
- 2 周平坤. 生物化学杂志, 1991, 7(5):513
- 3 Potten C S. Tren Genet, 1986, 2:278
- 4 金东雁. 分子克隆. 科学出版社, 1992, 306
- 5 郑秀龙. 生物物理学报, 1987, 3(3):311

DETECTING DNA DOUBLE STRAND BREAKS AFTER INONIZING IRRADIATION BY CONSTANT-FILED GEL ELECTROPHORESIS

Li Yu Zheng Xiulong Luo Chengji⁽¹⁾ Cai Jianming

Meng Xiangshun Wu Wei Gao Jianguo

(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

⁽¹⁾(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 630038)

ABSTRACT It was observed that constant-field gel electrophoresis can detect DNA double breaks(dsb) by irradiation. The dsb degree of mice thymocyte by 0~50 Gy (irradiation and the dsb repair in two hours after ³⁰Gy irradiation was studied, the “DNA ladder” was also found using the method.

KEYWORDS Constant field gel electrophoreses, Irradiation, DNA double strand breaks(dsb)