

# 用微孔滤膜法检测 $\gamma$ 射线引起的哺乳动物细胞DNA双链断裂及其重接

夏寿萱 徐惠英 章扬培 黄速敏 范国才

(军事医学科学院放射医学研究所)

**摘要** 本文改进了 Bradley 和 Kohn 测定 DNA 双链断裂的微孔滤膜法,并用于检测 $\gamma$ 射线引起的中国仓鼠卵巢细胞和小鼠骨髓细胞 DNA 的双链断裂,得到较好的剂量曲线,证明此法重复性好,灵敏度远较中性蔗糖密度梯度离心法高。同时也证明在上述细胞中辐射所致的 DNA 双链断裂是能够重接的。为 DNA 双链断裂能够重接的论点提供了又一个实验证据。

**关键词** DNA 损伤; DNA 修复; DNA 双链断裂; 膜过滤法。

## 引言

DNA 分子的双链断裂被认为是引起细胞死亡的主要原因之一,它的断裂程度的测定和断裂能否重接修复的问题引起了从事放射生物学研究者的重视。研究 DNA 双链断裂的经典方法是中性蔗糖密度梯度离心法。1979 年 Bradley 和 Kohn 等发展了检测 DNA 双链断裂的膜过滤法,并用此法观察了小鼠 L1210 细胞经 X 线照射后, DNA 双链断裂与照射剂量的关系<sup>[1]</sup>。1980 年 Weibezahn 用此法研究了中国仓鼠 V-79 细胞 DNA 双链断裂重接的动力学<sup>[2]</sup>,国内尚未见到这方面的报道。我们在用膜过滤膜法检测 $\gamma$ 线引起的 DNA 单链断裂及其修复的基础上<sup>[3]</sup>应用国产微孔滤膜,根据实际条件对 Bradley 和 Kohn 的方法做了改进,缩短了操作时间,提高了实验的重复性,并应用于体外培养的哺乳动物细胞和动物活体细胞,对 $\gamma$ 线引起的中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)和小鼠骨髓细胞的 DNA 双链断裂及其重接进行了初步探讨。

## 实验方法

### 1. 细胞 DNA 的标记

(1) CHO 细胞在含 10% 小牛血清的 Eagle 氏培养液中单层贴壁培养,照前 20 小时将处于指数生长期细胞用  $0.3 \mu\text{Ci/ml}$  的  $^3\text{H-TdR}$ (比放射性  $25\text{Ci/mM}$ )进行放射性同位素标记。照射前将已标记的长满瓶壁的细胞用含 0.25% 胰蛋白酶的 Hank's 液于  $37^\circ\text{C}$  消化 1~2 min,然后用培养液使细胞悬浮成均匀的悬液,每个样品约含  $2 \times 10^6$  个细胞,在冰浴中放置半小时后照射。

(2) 骨髓细胞用 Eagle 氏培养液从小鼠股骨中冲出,制成悬液后用尼龙绢过滤,调节浓度使每毫升悬液约含  $7 \times 10^6$  个有核细胞,加入  $^3\text{H-TdR}$ (比放射性  $25\text{Ci/mM}$ )使成  $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ ,于  $37^\circ\text{C}$  振荡保温 1 小时,每个样品用  $14 \times 10^6$  个细胞于冰浴中放置 30min 后照射。

## 2. 照射

在 0~4 °C 用  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  线照射, 照射 CHO 细胞的剂量率约为 1714.56~1677.46 R/min, 照射骨髓细胞的剂量率约为 1438.38~1407.46 R/min, 照射距离约为 30 cm, 照后细胞在 0~4 °C 保存待测。

## 3. DNA双链断裂的检测

(1) 实验装置 由洗脱漏斗、微孔滤膜、蠕动泵和收集器组成。洗脱漏斗与 Seitz 漏斗相似分为带有筛板(托住滤膜)的漏斗和盛洗脱液的圆筒两部份, 漏斗筛板的直径和圆筒内径皆为 25mm, 用一个有螺旋丝扣的套环将这两部分紧紧连接。漏斗和圆筒由不透光的聚氯乙烯制成, 为了防止液体渗漏, 在漏斗与圆筒连接处加一个聚四氟乙烯垫圈, 滤膜平整的压在垫圈与筛板之间, 漏斗下端引出的硅橡胶管经过蠕动泵与收集器相连。

(2) 溶胞 将细胞转移至直径 25mm 孔径 5 $\mu\text{m}$  的醋酸纤维素微孔滤膜(上海医药工业研究院生产)上, 用磷酸盐生理盐水缓冲液(1000 ml 水中含 NaCl 8g, KCl 0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, pH 为 7.6)冲洗 2 次, 每次 5ml, 然后于室温加入 10ml 溶胞液(2M NaCl, 0.02M EDTA 二钠盐, 1% Triton X-100, 用 4N NaOH 调 pH 至 8.8)与细胞作用 2min, 启动蠕动泵使溶液通过滤膜, 共需 10min 左右, 骨髓细胞溶胞液的成份同上, 但 Triton X-100 浓度为 3%, 与细胞作用约 20min。

(3) 脱蛋白 经溶液处理的细胞, 绝大部份染色质已脱去蛋白, 为使 DNA 大分子充分裸露出来, 再加入 6 ml 脱蛋白液[0.05M Tris, 0.05M 甘氨酸, 0.025M EDTA 二钠盐, 链霉蛋白酶 E (Pronase E, Merck) 2mg/ml, 用 4N NaOH 调 pH 至 9.6]。于 37 °C 保温 1 小时, 通过蠕动泵的作用使脱蛋白液通过滤膜, 并收集在一起。

(4) 洗脱 用 20 ml 洗脱液(0.05M Tris, 0.05M 甘氨酸, 0.025M EDTA 二钠盐, 2% SDS, 用 4N NaOH 调 pH 至 9.6)洗脱 4~5 小时, 流速 4~5 ml/h, 将洗脱液收集起来。

(5) 滤膜的清洗 从漏斗中取出滤膜, 用 15ml 0.4N NaOH 少量多次冲洗滤膜的背面, 并使溶液通过漏斗和硅胶管以清洗残留的放射性, 收集此部份。

(6) 滤膜的处理 将滤膜放入计数瓶中, 加入 0.4ml 0.44N HCl, 于 70 °C 水解 30min, 然后加入 2.5ml 0.4N NaOH 中和, 放置 30min。

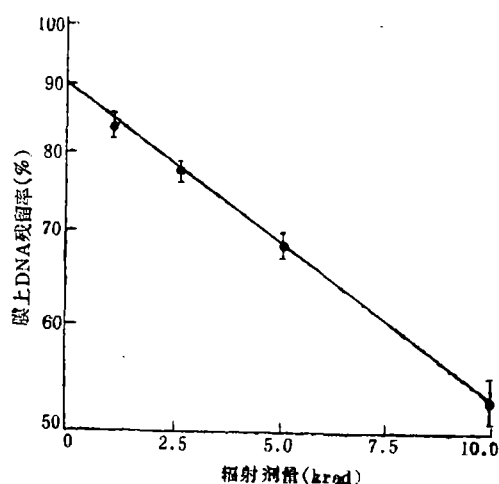


图 1 CHO 细胞 DNA 双链断裂的剂量曲线。

(7) 放射性测量 将上述收集的脱蛋白液, pH 9.6 洗脱液, NaOH 洗液和膜的水解液, 分别充分混匀, 各取 0.5ml 制样, 加 7ml 闪烁液(PPO 2g, POPOP 0.02g, 萘 32g, 二甲苯 154ml, 二氧六环 154ml, 无水乙醇 136ml, 冰醋酸 3.9 ml)。充分混匀, 在液体闪烁计数仪上测量放射性。

(8) 结果计算 以残留在膜上的放射性占总放射性的百分数(称为膜上 DNA 残留率)来衡量 DNA 双链断裂的程度, 残留率越小, 链断裂越多

$$R = \frac{C_4}{C_1 + C_2 + C_3 + C_4} \times 100\%$$

式中  $C_1$  为 6ml 脱蛋白液的总放射性;  $C_2$  为 20ml pH 9.6 洗脱液的总放射性;  $C_3$  为 15 ml NaOH 洗液

的总放射性； $C_4$  为 2.9ml 滤膜水解液的总放射性。

4. 双链断裂重接的检测

照射后的细胞在上膜前于 37℃ 水浴中保温 30 min，测定其双链断裂并与保温前比较。

实 验 结 果

1. CHO 细胞 DNA 双链断裂

CHO 细胞经不同剂量  $\gamma$  线照射后膜上 DNA 残留率在 1~10krad 范围内随着照射剂量的增加而降低，膜上 DNA 残留率(Y)的对数与照射剂量(X)之间有很好的线性关系，(见图 1)。回归方程： $100 \lg Y = -4.2705 - 0.00236X$ ，相关系数： $r = -0.9942$ 。

2. CHO 细胞 DNA 双链断裂的重接

CHO 细胞经 10 krad  $\gamma$  线照射后于 37℃ 保温 30min，再检测膜上 DNA 残留率，发现残留率由  $53.52 \pm 2.48\%$  提高至  $75.28 \pm 1.73\%$ ，两组相比  $P < 0.01$ ，统计差别非常显著，说明断裂了的 DNA 有重接发生，(见表 1)。

3. 小鼠骨髓细胞 DNA 的双链断裂

用此法对受  $\gamma$  线体外照射后的小鼠骨髓细胞 DNA 双链断裂进行检测，从图 2 可以看到从 5~30krad 范围内随着照射剂量的增加，膜上 DNA 残留率逐渐降低，以膜上 DNA 残留率(Y)的对数对照射剂量(X)作图，线性关系良好。回归方程为  $100 \lg Y = -4.1765 - 0.002174X$ ，相关系数  $r = -0.9893$ 。

4. 小鼠骨髓细胞 DNA 双链断裂的重接

表 2 为小鼠骨髓细胞经 10Krad 照射后于 37℃ 保温 30min，DNA 双链断裂重接修复的结果。保温组膜上 DNA 残留率为  $64.01 \pm 2.20\%$  比对照组的  $47.38 \pm 2.68\%$ ，提高了 16.63%， $P < 0.01$ ，差别非常显著，这和在 CHO 细胞上所得结果一致，再次证明  $\gamma$  线引起的细胞 DNA 双链断裂是能够重接的。

表 1 CHO 细胞照后保温 30min 膜上 DNA 残留率(%)

| 0 rad         | 10 Krad    | 10 Krad加保温 30min |
|---------------|------------|------------------|
| 97.85         | 53.62      | 76.91            |
| 91.49         | 56.80      | 70.16            |
| 93.81         | 57.36      | 80.30            |
| 92.87         | 53.60      | 73.53            |
| 94.10         | 58.01      | 71.37            |
| 91.41         | 41.71      | 79.43            |
| X 93.59       | 53.52      | 75.28            |
| SE $\pm 0.97$ | $\pm 2.48$ | $\pm 1.73$       |

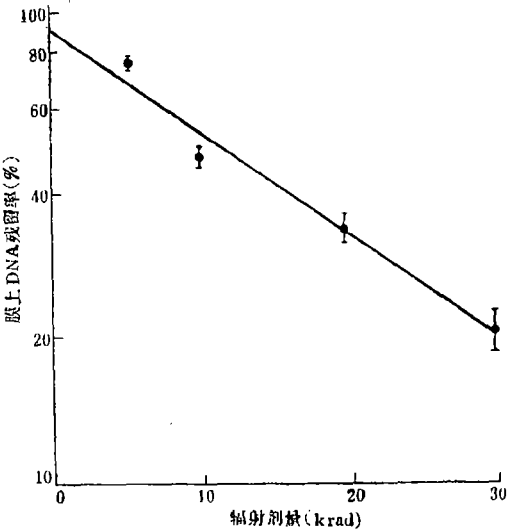


图 2 骨髓细胞 DNA 双链断裂的剂量曲线

表 2 小鼠骨髓细胞照后保温 30min 膜上残留率(%)

| 0 rad           | 10 Krad    | 10 Krad加保温 30 min |
|-----------------|------------|-------------------|
| 80.38           | 53.77      | 55.01             |
| 86.17           | 46.37      | 67.89             |
| 94.13           | 42.60      | 68.97             |
| 92.56           | 56.16      | 68.09             |
| 97.77           | 46.56      | 62.41             |
| 99.58           | 38.82      | 61.69             |
| $\bar{x}$ 91.77 | 47.38      | 64.01             |
| SE $\pm 2.97$   | $\pm 2.68$ | $\pm 2.20$        |

## 讨 论

(1) 中性蔗糖密度梯度离心法是检测 DNA 双链断裂的经典方法<sup>[4]</sup>, 这个方法的特点是对 DNA 断裂级份划分清晰, 并能计算其分子量, 但需要昂贵的超速离心机, 操作复杂而且费时, 特别是用来检测分子量大的哺乳动物细胞 DNA 时会出现异常沉降。微孔滤膜法与上法比较, 具有设备简单, 操作方便, 灵敏度高等优点, 但不能划分断链的级份和计算分子量。我们参考了 Bradley 和 Kohn 的方法, 改变了这个方法的溶胞、脱蛋白、洗脱和膜处理等条件, 选用适当孔径的醋酸纤维素滤膜, 在一个实验阶段中都使用同一批号的膜, 并严格控制每片的重量幅度, 缩短了操作时间、提高了实验的重复性和可靠性。我们用国产短小芽胞杆菌的碱性蛋白酶(中国科学院微生物研究所制备)代替进口的链霉菌蛋白酶进行试验, 取得满意的结果, 因此, 上述改良方法完全适用于我们的实际情况。从图 1 可见本法对双链断裂的检测灵敏度可达 1krad, 而中性蔗糖密度梯度离心法对双链断裂的检测灵敏为 25~50krad<sup>[4~5]</sup>, 因此本法远较超速离心法灵敏。我们的方法灵敏度与 Bradley 和 Kohn 的方法相似<sup>[1]</sup>, 而剂量曲线的线性关系较后者为佳。

本实验中所用的骨髓细胞数较 CHO 细胞多, 这是因为  $^3\text{H}$ -TdR 与骨髓细胞保温的时间仅为 1 小时, 而与 CHO 细胞保温的时间为 20 小时, 前者远者较后者为短, 为了使放射性测量达到足够准确度, 故使用了较多的骨髓细胞, 但在我们的溶胞条件下, 并不影响分析结果。

(2) 如将图 1 的剂量曲线外推至 30krad, 并与图 2 的剂量曲线相比, 发现其斜率相似, 提示 CHO 细胞 DNA 和骨髓细胞 DNA 在受照后产生双链断裂的机率是相似的, 细胞辐射敏感性的差别原因是多方面的, 不能单从 DNA 断裂的难易来解释。

(3) 关于哺乳动物细胞中 DNA 双链断裂能否重接的问题多年来存在着争论, 例如, Dugle 等<sup>[6]</sup>用中性蔗糖密度梯度离心法在经受 X 射线 10~50krad 照射的中国仓鼠 V-79 细胞中不能观察到双链断裂的重接, Lehmann 等<sup>[5]</sup>用同样方法在小鼠白血病细胞中观察到当照射剂量大于 20krad 时, 照后保温不能使双链断裂重接, 而当剂量低于 20krad 时, 则可观察到重接现象。Corry 等<sup>[7]</sup>用同法在 CHO 细胞中证明双链断裂能够重接。Lehmann 等<sup>[8]</sup>近来也改变了观点, 认为经  $\gamma$  射线辐照的人纤维细胞中的 DNA 双链断裂是可以修复的。Weibezahn 等<sup>[2]</sup>用膜过滤法证明在中国仓鼠 V-79 细胞中 DNA 双链断裂是能够重接的。我们的实验证明无论在体外培养的 CHO 细胞中或在离体的骨髓细胞中 DNA 双链断裂都是能够重接的, 为辐射所致细胞 DNA 双链断裂可以重接的论点提供了又一个证据。

(4) DNA 单链断裂的重接主要依靠 DNA 连接酶进行, 而双链断裂的重接则依靠连接和重组。我们的实验已经证明 DNA 单链断裂的重接不受丝裂霉素、羟基脲、放射菌素 D、环己亚胺等代谢抑制剂的影响<sup>[3]</sup>, 而可能依靠受照细胞中原已存在的酶系统进行, 关于这个特点文献也有类似报道<sup>[9]</sup>。在大剂量射线照射下细胞会发生部分死亡, 但修复酶系还将在一段时间内起作用, 在增殖死亡的细胞中更是如此, 因此, 在 10krad 照射后 DNA 双链断裂发生重接是可以理解的。

(5) 这种方法不仅可以用来从分子水平上研究辐射损伤及其修复规律, 而且可以用来评价辐射防护剂和致敏剂, 也可用于致癌致突变的研究。

## 参 考 文 献

- [1] M. O. Bradley and K. W. Kohn, *Nucleic Acids Res.*, 7(3), 793(1979).

- [2] K. F. Weibezahn and T. Coquerelle, *Radiat. Environ. Biophys.*, 17, 351 (1980).  
[3] 章扬培, 夏寿萱, 徐惠英, 生物化学与生物物理进展, 1, 37 (1983).  
[4] W. Veatch and S. Okada, *Biophys. J.*, 9, 330 (1969).  
[5] A. R. Lehmann and G. M. Ormerod, *Biochim. Biophys. Acta.*, 217, 268 (1970).  
[6] D. L. Dugle, C. J. Gillespie and J. D. Chapman, *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.*, 73, 809 (1976).  
[7] P. M. Corry and A. Cole, *Nature (New Biol.)*, 245, 100 (1973).  
[8] A. R. Lehmann and S. Stevens, *Biochim. Biophys. Acta.*, 474, 49 (1977).  
[9] Chiu songmao and L. Nancy. Oleinick, *Radiat. Res.*, 82, 146 (1980).

(1983年3月15日收到)

## THE DETECTION OF $\gamma$ -RAY INDUCED DNA DOUBLE STRAND BREAKS AND THEIR REJOINING IN MAMMALIAN CELLS BY MEMBRANE FILTRATION METHOD

Xia Shouxuan    Xu Huiying    Zhang Yangpei    Huang Sumin    Fan Guocai

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences)

**ABSTRACT** The membrane filtration method of Bradley and Kohn was improved and used to detect the double strand breaks of DNA in irradiated Chinese hamster ovary cells and mouse bone marrow cells. The percentage of DNA retained on the membrane was inversely proportional to the radiation dose. The method had good reproducibility and was more simple and more sensitive than the classic neutral sucrose gradient centrifugation method. By this method the rejoining of double strand breaks could also be observed in both types of cells. The results provided an additional evidence that the double strand breaks could be repaired in mammalian cells.

**KEY WORDS** DNA Damage; DNA Repair; DNA Double strand breaks; Membrane filtration method.