

过热对细胞DNA辐射损伤与修复的影响 I 滤膜—荧光法及其在DNA结构检测中的应用

孟祥顺 郑秀龙

(上海第二军医大学)

摘要 本文报道了用输液夹代替蠕动泵调控洗脱速度,改进和建立了能用于分裂和不分裂细胞DNA单链断裂检测的微孔滤膜洗脱—荧光法。对其中一些影响因素作了较详细的探讨。结果表明:改进后的方法灵敏、简便、重复性较好,可进行批量样品分析。并用此法研究了小鼠淋巴瘤细胞型白血病 L₇₁₁₂ 细胞DNA辐射损伤与修复的规律。

关键词 微孔滤膜洗脱; 荧光法检测; 3,5-二氨基苯甲酸盐酸盐; L₇₁₁₂ 细胞; DNA 单链断裂与重接。

前 言

DNA 的结构损伤直接影响了细胞的各种生物学功能,DNA 损伤与修复是涉及到分子肿瘤学、分子药理学、分子遗传学、环境保护等许多学科的基础理论问题^[1]。尤其是在分子放射生物学中的意义越来越受到人们的关注。

Kohn^[2~4] 首次报道用微孔滤膜分离DNA分子片段大小的新技术。我们结合本室条件,立足国内材料,对Kohn法作了改进。用输液夹代替蠕动泵控制洗脱速度,并对分离后的DNA与3,5-二氨基苯甲酸盐酸盐(下简称DABA)反应产物进行荧光测量。解决了不能用同位素标记的不分裂细胞DNA链断裂的检测问题。经过多次实验建立了微孔滤膜洗脱—荧光法,并用此方法研究了L₇₁₁₂ 细胞DNA辐射损伤及断链重接的规律。

材 料 与 方 法

1. 针头滤器

选用上海医工院仿美 Millipore 产品研制的全塑料针头滤器,内有筛网板支持滤膜。滤器上接注射器外管容纳各种溶液,下连一段乳胶管及玻璃小滴管,乳胶管上置输液夹调控洗脱速度,其装置如图1。

2. 微孔滤膜

选用上海医工院研制的混合纤维素酯型微孔滤膜^[5],直径25 mm,平均孔径1.2 μ ,选用厚度为0.12~0.16 mm,重量为14~18 mg的滤膜进行实验。

3. 试剂

(1) 溶胞液 2 M NaCl, 0.02 M Na₂EDTA, 0.2% Triton X-100, 用NaOH调pH至8.2。

(2) 洗脱液 贮备液 A: 0.1 M Na₂EDTA; 贮备液 B: 5 N NaOH。滤膜洗脱液: A 液 100 ml, B 液 10 ml, 调 pH 至 12.3, 加水至 1000 ml。滤膜浸泡液: A 液 100 ml, B 液 20 ml, 调 pH 至 12.8~12.9, 加水至 1000 ml。

(3) 2 M DABA DABA 由本室合成^[6], 临用前配制。

(4) 0.2% 牛血清白蛋白(BSA) 上海牛奶公司产品。

其余试剂均为分析纯, 所有试剂均用去离子水(电导率: $0.2 \sim 0.4 \times 10^{-8} \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)配制。

4. 细胞

由上海医工院提供腹水型小鼠淋巴细胞白血病 L₇₇₁₂ 细胞^[7]。抽取腹水后用生理盐水稀释至适当浓度, 经 120 目尼龙布过滤以除去腹水中纤维组织。精确吸取 $7 \sim 8 \times 10^5$ 个细胞, 加入 2 ml RPMI-1640 培养液(含 20% 未灭活马血清)制成悬液, 放入冰水浴中待用。

5. 照射条件

将细胞悬液于冰水浴中距 ⁶⁰Co 源 40 cm 处, 以剂量率为 374.8~409.2 rad/min 的 γ 线照射, 照后细胞仍置于冰水浴中备用。

6. 洗脱滤膜

将细胞全部移入滤器的滤膜上, 用 6 ml 冰冷磷酸缓冲液(pH 7.5~7.6)轻轻洗涤细胞二次, 加 6 ml 溶胞液任其自由流过滤膜, 再用 10 ml 1 mM Na₂EDTA 将溶胞液洗涤干净。最后加入 10 ml 滤膜洗脱液, 作用 2~3 分钟后调整输液夹以 0.2 ml/min 的速度进行洗脱, 精确收集洗脱液。

为避免发生可能的额外 DNA 损伤, 洗脱时注意避光, 防止抖动滤膜。洗脱完毕后取下输液夹, 室温放置 4~6 小时使滤膜干燥。取出滤膜后放入盛有 25 ml 滤膜浸泡液的瓶内, 撕碎、震荡、在室温下再放置 12 小时。将收集的滤膜洗脱液移入 25 ml 容量瓶内, 最后加至刻度。

7. 荧光检测

从上述滤膜浸泡及滤膜洗脱液中各取 5 ml, 分别加入 0.5 ml BSA 和 0.3 ml (100%) TCA, 混匀后冰箱放置 4~6 小时。离心沉淀, 用无水乙醇洗涤沉淀一次, 离心后将沉淀于 60℃ 烘干。每管加入 2 M DABA 25 μ l, 于 60℃ 水浴中保温 30 分钟, 最后加入 1 ml 0.6 N 过氧酸。按郑秀龙等^[8]选用的最佳条件, 用日制 MPF-4 型荧光分光光度计于 $\lambda_{\text{EX}} 408 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} 498 \text{ nm}$ 处分别测量膜上、膜下 DNA 和空白的荧光强度。扣除空白后按式(1)计算膜上 DNA 存留%(R), 以 R 值的变化来表明 DNA 分子受损伤程度。每次测量时用 1 μ g/ml 的硫酸喹啉(溶于 0.1 N H₂SO₄)校准测试条件。按 Pala^[9]提出的式(2)计算某一洗脱时刻的洗脱速度常数(K), 以 K 值的大小表示 DNA 分子片段大小。

$$R = \frac{\text{膜上荧光强度}}{\text{膜上荧光强度} + \text{膜下荧光强度}} \times 100\% \quad (1)$$

$$K(\text{ml}^{-1}) = \frac{-\ln(\text{膜上 DNA 存留}\%)}{V(\text{洗脱液体积 ml})} \quad (2)$$



图 1 洗脱装置示意图

实 验 结 果

1. 微孔滤膜洗脱—荧光法检测

(1) 输液夹代替多道蠕动泵 从下述两方面验证了调节输液夹控制洗脱速度代替蠕动泵的可行性。66 次测试的结果见表 1 和表 2。

从表 1 可看出, 在测试的洗脱速度内, 洗脱液体积与从洗脱器滴出的滴数间呈正比关系, 表明洗脱液在 10~0.5 ml 范围内, 洗脱过程基本是均匀的。表 2 中在 0.06~2.44 ml/min 范围内, 随洗脱速度的增加, 所需洗脱时间相应成比例减少。说明用输液夹代替蠕动泵调控洗脱速度是可行的。

(2) 不同材料的滤膜对 R 值的影响 不同材料的滤膜因其对 DNA 的吸附能力不同, 可影响膜上 DNA 存留%。我们用醋酸纤维素和混合纤维素酯型滤膜对未受照 L₇₇₁₂ 细胞 DNA 进行洗脱动力学的比较, 结果如图 2。在每一洗脱时刻, 混合酯膜的 R 值均高于醋酸酯膜。我们认为使用混合酯膜可提高检测的灵敏度。

表 1 洗脱液体积与滴出滴数的关系

洗脱液体积(ml)	10	5	4	3	2	1	0.5
滴出的滴数(个)	301	154	122	92	59	30	15

表 2 不同速度滴完 5 ml 洗脱液所需的时间

	滴 速 (滴/分)				
	2	10	15	20	80
所需时间(分)	82'10"	16'38"	11'13"	8'22"	2'30"
平均洗脱速度 (ml/min)	0.06	0.3	0.45	0.6	2.44

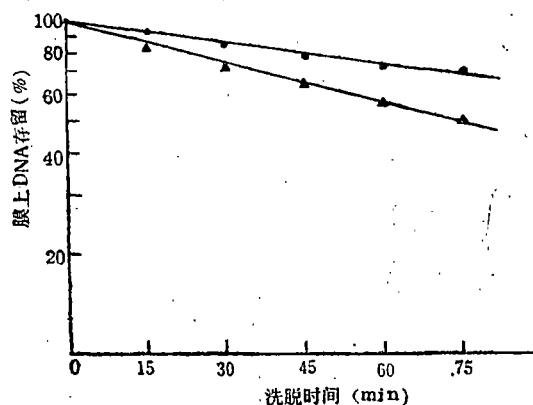


图 2 不同 pH 的洗脱液对 R 值的影响

●—●混合纤维素酯型
▲—▲醋酸纤维素酯型

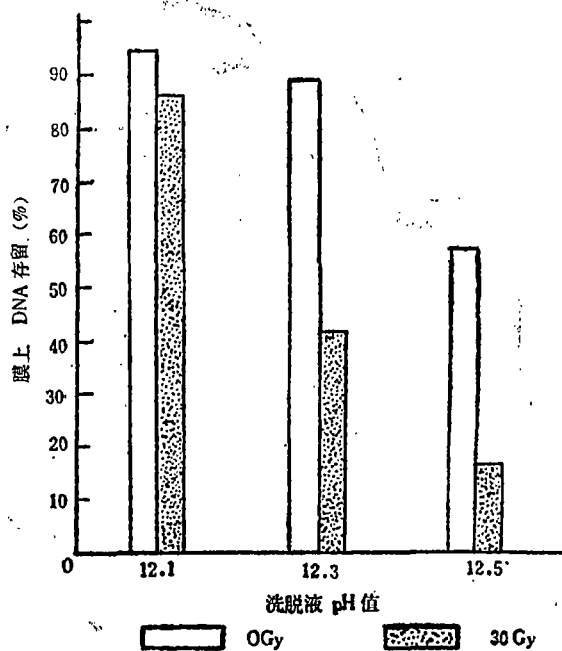


图 3 不同 pH 的洗脱液对 R 值的影响

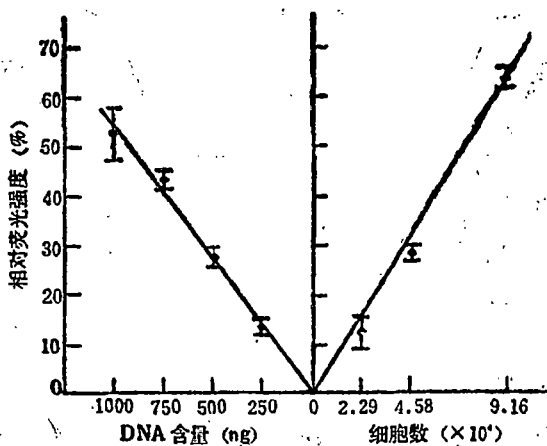


图 4 不同细胞数及小牛胸腺 DNA 量与相应荧光强度的关系

(3) 洗脱液 pH 对 R 值的影响 我们用三种 pH(12.1,12.3,12.5)洗脱液分别对受照(30 Gy)和未受照的 L_{7712} 细胞 DNA 进行洗脱,比较 R 值的变化,结果如图 3。其中以 pH 12.3 的洗脱效果最好,受照前后 R 值变化明显,且照前 R 值较大,对 DNA 检测的灵敏度较好。其它 pH 则较差,因此每次实验前均对洗脱液 pH 进行严格调整。

(4) L_{7712} 细胞数与荧光强度的关系 用不同量的小牛胸腺 DNA 及不同数量的细胞溶胞后的细胞 DNA 在相同条件下分别与 DABA 反应后测荧光强度,结果如图 4。表明 0~1000 ng 小牛胸腺 DNA 及 $2.29\sim9.16\times10^4$ 范围内细胞数与各自的荧光强度均有较好的线性关系。细胞数与荧光强度的回归方程为: $\hat{y} = 5.0413 + 7.0745 \times 10^{-4} \cdot X (r = 0.9976)$ 。因此在以后的实验中均在线性范围内选用 $7\sim8\times10^4$ 个细胞/样品进行分析。

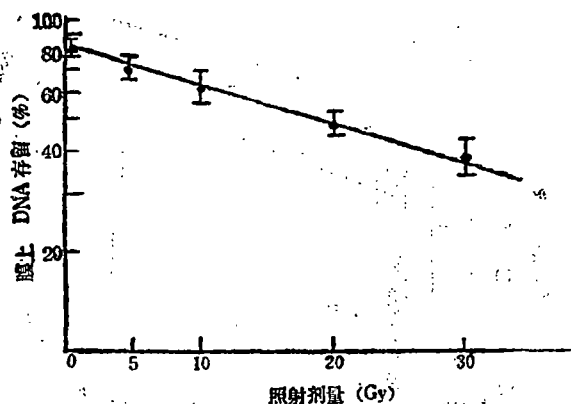


图 5 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射后剂量与 R 值的关系

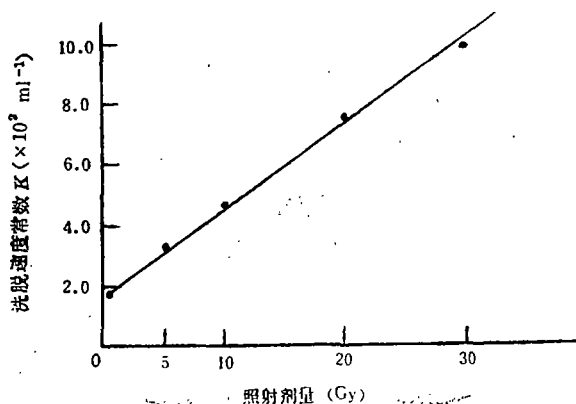


图 6 照射剂量与 K 值的关系

2. 照后 L_{7712} 细胞 DNA 的单链断裂

细胞经 5~30 Gy γ 线照射后,随照射剂量增加, R 值逐渐减少,结果如图 5。表明随照射剂量增加 DNA 单链断裂增加,二者有明显的负线性关系。回归方程为 $\hat{y} = 79.79 - 0.0147 \cdot D (r = -0.9881)$ 。在 5~30 Gy 范围内,随照射剂量的增加通过滤膜的 DNA 量亦相应增加, K 值相应变大,二者有明显的正线性关系,如图 6。提示随剂量增加 DNA 分子片段逐渐变小。

3. 照后洗脱动力学的变化

L_{7712} 细胞经 5~30 Gy γ 线照射后,按上述方法溶胞加入 15 ml 洗脱液,每洗脱 15 分钟(3 ml)收集一个组分,分别测定各组分的荧光强度并计算各剂量组不同洗脱时间的 R 值,其洗脱动力学曲线如图 7。

由图 7 可见,在每一照射剂量水平,随洗脱时间的增加 R 值逐渐减少;在每一洗脱时间,随照射剂量的增加 R 值亦相应减少。各洗脱时刻的 K 值列于表 3,照射剂量与各洗脱时间的平均洗脱速度常数的关系如图 8。

由表 3 和图 8 可看出,各剂量水平的 K 值基本变化不大,而平均 K 值则随照射剂量的增加呈线性增加。提示 K 值的变化基本不受洗脱时间的影响而主要取决于照射剂量。剂量越大,平均洗脱速度常数越大, DNA 单链断裂越多,分子片断越小。

4. 照后细胞 DNA 单链断裂的重接

为了观察 L_{7712} 细胞受照后有无将 DNA 单链断裂重接修复的能力,我们将细胞悬液于 0℃ 经 30 Gy γ 线照射后立即置 37℃ 水浴中保温不同时间,分别测定各保温时间的 R 值。结果如图 9,

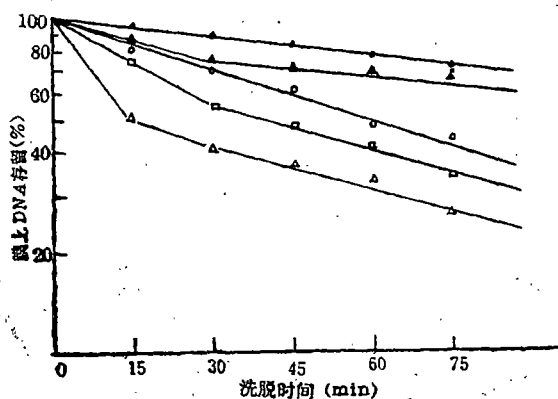


图 7 不同剂量的洗脱动力学曲线
 ····—0 Gy; ▲—▲5 Gy; ○—○10 Gy;
 □—□20 Gy; △—△30 Gy;

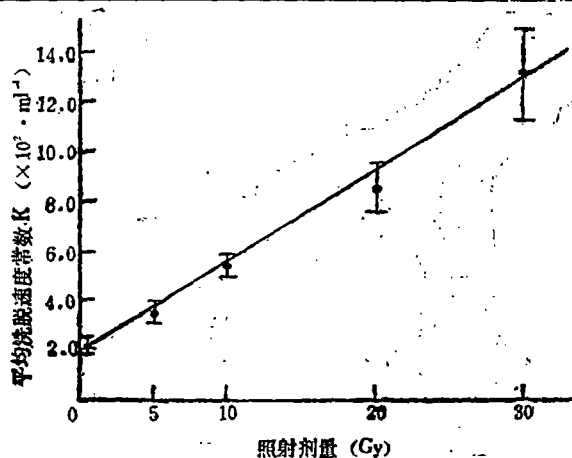


图 8 照射剂量与平均洗脱速度常数的关系

表 3 不同剂量、不同洗脱时刻的 K 值 ($\times 10^3 \text{ml}^{-1}$)

照射剂量 (Gy)	洗 脱 时 间 (min)					$\bar{x} \pm S.E$
	15	30	45	60	75	
0	1.67	1.98	2.03	2.24	2.41	2.07 ± 0.13
5	4.07	4.60	3.44	2.66	2.73	3.50 ± 0.38
10	4.45	5.50	5.57	6.33	5.56	5.49 ± 0.30
20	9.02	10.58	8.29	7.33	7.29	8.50 ± 0.61
30	22.58	14.74	11.29	9.01	8.85	13.29 ± 2.55

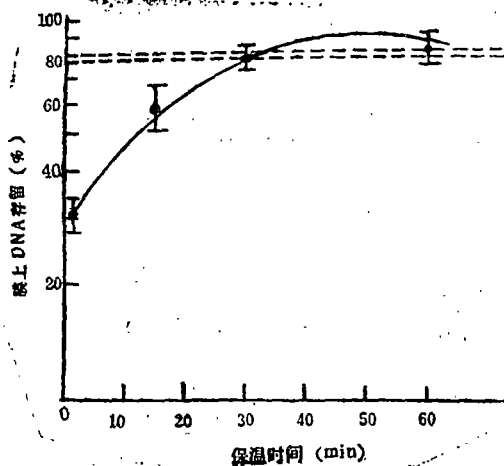


图 9 不同保温时间 R 值的变化
 (-----对照水平)

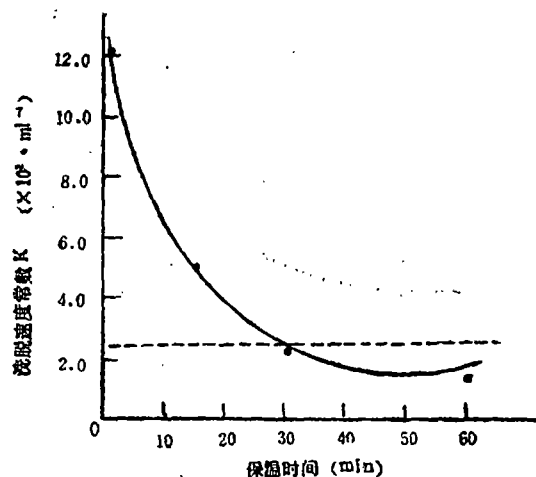


图 10 不同保温时间 K 值的变化
 (-----对照水平)

不同保温时间 K 值的变化如图 10。

上述结果表明, L_{7712} 细胞经 30 Gy γ 线照射后于 37℃ 保温, 随保温时间的增加膜上 DNA 存留 % 逐渐增加, 洗脱速度常数逐渐变小, 修复曲线呈指数型。证实 L_{7712} 细胞在保温过程中能将 DNA

单链断裂进行重接修复,使分子片段变大。保温 30 分钟后,膜上 DNA 存留%及洗脱速度常数基本恢复到照前水平。延长保温时间到 1 小时,膜上 DNA 存留%与未照射的对照组及保温 30 分钟组相比无明显改变。

讨 论

1. 微孔滤膜洗脱—荧光法

表 1、表 2 的结果表明用输液夹代替蠕动泵控制洗脱速度是均匀的,因而本方法设备简单,可批量分析样品,便于推广。除在前面滤膜材料等进行观察外,我们还对 DABA 与 DNA 反应的特异性及 BSA、TCA 沉淀 DNA 后的荧光检测效率作了观察。对前者我们分别用小牛胸腺 DNA 和实验中所使用的 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaCl 、 KCl 、 Na_2EDTA 、Triton X-100、BSA、TCA 等 8 种试剂同 DABA 反应,结果表明, DABA 与 DNA 反应的荧光强度比与其它试剂反应的荧光强度高 1000 倍。上述 8 种试剂对 DABA 与 DNA 反应后的荧光强度干扰亦较小,抑制作用均小于 1%。对后者我们比较了 DNA 经 BSA、TCA 沉淀前后与 DABA 反应的荧光强度,两者在 0—1000 ng 范围内, DNA 量与相应荧光强度间均有较好的线性关系(未刊出)。DNA 沉淀前后两线性方程的斜率之比为 55.86%,即为沉淀法检测 DNA 的效率,与 Brash^[10] 报告的结果相似。这可能是由于 DNA 中含有小分子片段未能完全沉淀及操作损失所致。

2. L_{7712} 细胞 DNA 辐射损伤与修复

本研究所使用的 L_{7712} 细胞是国内新建立的肿瘤细胞模型,电离辐射引起 L_{7712} 细胞 DNA 单链断裂与重接修复的规律国内尚未见报道。我们的结果表明(图 5、图 9)同其它哺乳动物细胞一样^[11], L_{7712} 细胞受不同剂量的 γ 线照射后可使 DNA 产生不同程度的单链断裂损伤。照后在适当条件下保温时单链断裂可重接修复。

值得注意的是本研究观察到 L_{7712} 细胞经 30 Gy γ 线照射后保温 30 分钟即可修复到照前水平,结果与刘楠^[12]等用羟磷灰石离心法研究的结果相同,但郑秀龙^[11]用人转化淋巴细胞研究的结果表明:30 Gy γ 线照射后 37℃保温 2 小时仍未恢复到照前水平。这些结果是否提示了肿瘤细胞与正常细胞修复速度的不同及这种修复对细胞活存或死亡的意义如何,都是我们有待研究和感兴趣的问题。

从细胞辐射损伤效应的洗脱动力学可看出(图 8 和表 3)(1)每一剂量水平的 K 值基本不依赖于洗脱时间,显示照后 DNA 损伤的分子片段大小主要取决于照射剂量。(2)随照射剂量的增加,平均洗脱速度常数呈线性增加,表明整个洗脱过程是均匀的。(3)在本实验条件下,45 分钟洗脱时间(10 ml 左右洗脱液)各剂量组的 K 值与平均洗脱速度常数十分接近,提示了洗脱时间过长或过短(洗脱液体积过大或过小)均偏离整个洗脱过程的平均洗脱速度常数较远,会给实验带来较大偏差,所以洗脱液体积以 10 ml 左右为好。上述为以往文献中未注意的问题。

上述改进后建立的微孔滤膜洗脱荧光法,经对 L_{7712} 细胞辐射损伤与修复的研究应用验证结果表明:此法灵敏度高,重复性较好,为一般实验室开展 DNA 结构损伤与修复的研究提供了较好的方法。还可用于化学毒剂损伤机理、环境致癌物的监测、抗肿瘤药物的筛选等许多研究领域。

参 考 文 献

- [1] 郑秀龙,生物化学与生物物理学进展,4,19(1982)。

- [2] K. W. Kohn, *Cancer Res.*, 33, 1849(1973).
- [3] K. W. Kohn, *Biochemistry*, 13(2), 4134(1974).
- [4] K. W. Kohn, in B. C. Friedberg, P. C. Hanawalt, eds "DNA Repair a Laboratory Manual of Research Procedures" Vol 1, part B. pp 379~401 New York, 1981.
- [5] 上海医药工业研究院树脂室微孔滤膜专题组, 医药工业, 7, 7(1980).
- [6] 孟祥顺, 郑秀龙, 赵芳, 高建国, 第二军医大学学报, 4, 335(1982).
- [7] 郑升, 孟德鸣, 张永基, 陈海明, 杨金龙, 潘瑞彰, 肿瘤, 1, 6(1982).
- [8] 郑秀龙, 赵芳, 高建国, 生物化学与生物物理学进展, 3, 38(1983).
- [9] M. Pala, *Mutation Res.*, 103, 207(1982).
- [10] D. E. Brash, *Radiat., Res.*, 91, 169(1982).
- [11] 郑秀龙, 赵芳, 刘巧年, 高建国, 生物化学与生物物理学报, 15(1), 17(1983).
- [12] 刘楠, 郑秀龙, 生物化学与生物物理学进展, (付印中).

(1983年11月9日收到)

THE EFFECTS OF HYPERTHERMIA ON RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE AND ITS REPAIR I

The Method of Alkaline Elution-Fluorometric Assay and
Its Application on Studying DNA Structure

Meng Xiangshun Zheng Xiulong
(Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT In this paper we describe an improved alkaline filter elution-fluorometric method for detection cell DNA radiation damage and its repair. We used screw clamp in place of peristaltic pump to adjust elution rate acquired the same results. The influence of some factors on this method was also studied.

Immediately after r-ray irradiation (5~30 Gy) of L_{7712} cells, it was shown a significant negative linear relationship between doses and the percentage of DNA remaining on the filter. The repair of damaged DNA could also be measured by our method. This improved method had good reproducibility, sensitivity and could proceed in batch analysis of samples.

KEY WORDS Millipore filter alkaline elution; Fluorometric assay; 3,5-Diaminobenzoic acid dihydrochloride; L_{7712} cells; DNA single strand breaks and repair.