

γ 射线所致哺乳动物细胞 hprt 基因 突变分子机理的初步探讨

季守平 范国才 吴 英 章扬培

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 为研究电离辐射致突的分子机理, 采用限制性片段长度多态性分析法(RFLPs)观察 γ 射线诱导的 CHO-K 1 和 HeLa MR 突变细胞 hprt 基因结构的变化, 并用 Northern 杂交和狭缝杂交方法分析了 CHO-K 1 突变细胞 hprt 基因的表达情况。实验结果提示: 电离辐射引起 hprt 基因结构损伤并进而导致 mRNA 转录的缺陷。

关键词 电离辐射, hprt 基因, 哺乳动物细胞, RFLPs

随着分子生物学技术的发展, 特别是分子杂交、DNA 测序和 PCR 扩增技术的应用, 人们在辐射致突分子机理研究方面取得了长足的进步。然而, 电离辐射造成的损伤复杂, 研究难度大, 进展慢, 尚需进行深入细致的研究。

文献[1]曾报道用 ^{60}Co - γ 射线照射中国仓鼠卵巢 CHO-K 1 细胞和人宫颈癌 HeLa MR 细胞, 获得这两种细胞次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因(hprt)缺陷的突变株; 观察了突变频率与照射剂量间的量效关系并在酶学水平上加以证实。本实验主要采用分子杂交技术进一步分析电离辐射诱导的突变细胞。用限制性片段长度多态性(RFLPs)法分析突变细胞 hprt 基因 DNA 结构的变化; 用 Northern 杂交法分析 CHO-K 1 突变细胞 hprt 基因表达情况; 并用狭缝杂交技术较为准确地测 CHO-K 1 突变细胞 hprt 基因 mRNA 转录的相对水平。本实验将从基因结构改变、基因转录水平的变化及酶活性的缺失三个水平初步探讨辐射致突可能的分子机理。

1 材料与 方法

1.1 DNA 提取和 Southern 印迹

收集 2×10^7 个细胞, 用 1 ml PBS 混匀, 加入 10 ml 溶胞液(0.1 mmol/L NaCl, 0.02 mol/L Tris-HCl, 6 mmol/L EDTA, 0.5 % SDS, pH 8.0), 充分混合后加入 50—80 μl 无 DNase 的 RNase A(10 mg/ml), 37℃下保温 6 h。加入 150 μl 的蛋白酶 K(10 mg/ml), 37℃下过夜。用等体积的酚/氯仿(2:1)饱和液抽提 4 次。吸取上清, 加二倍体积的冷无水乙醇沉淀 DNA, 用 70 % 乙醇洗沉淀 2—3 次, 室温下风干。加 1 ml TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5)溶解 DNA。

取 CHO-K 1 和 HeLa MR 及其突变细胞 DNA 各约 20 μg , 分别加入 80 单位的 EcoR I 酶或 Hind III 酶, 37℃下消化 12 h 以上。经 0.7 % 琼脂糖凝胶电泳(25 V, 16 h)分离 DNA 片段。凝胶

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1993-09-29, 修改稿 1994-2-12

变性、中和后,以 $6\times\text{SSC}$ 为转移液,用 Southern 法印迹 18 h^[2],把 DNA 从凝胶转移到硝酸纤维素膜上,80℃烤膜 2 h。

1.2 细胞总 RNA 的提取

参照 Chomczynski^[3]的 AGPC 一步法提取。向长满细胞的培养皿中加入 1 ml D 液 (4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠, 0.5% 十二烷基肌酸钠, 0.1 mol/L β -巯基乙醇),将细胞溶破液分装到 2 个 Eppendorf 管中,依次加入 50 μl 2 mol/L 乙酸钠 (pH 4.0)、500 μl 饱和酚和 100 μl 氯仿/异戊醛 (49:1),充分混匀,置冰浴中 15 min。于 4℃ 下以 15000 r/min 离心 20 min,取上相加入等体积的异丙醇, -20℃ 下放置 1 h。4℃ 下 15000 r/min 离心 15 min,沉淀风干后加 300 μl D 液溶解,加入 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置 1 h。再以 15000 r/min 离心 15 min 沉淀用 70% 的乙醇洗涤,风干,加入 50 μl 0.5% SDS,在 65℃ 水浴中溶解 RNA。

1.3 RNA 的 Northern 印迹和狭缝点样

取 20 μg 每种细胞总 RNA,依次加入 4.5 μl 水、2.0 μl 5 $\times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液 {0.1 mol/L 3-[N-吗琳代]丙磺酸 (MOPS) (pH 7.0), 40 mmol/L 乙酸钠, 5 mmol/L EDTA, pH 8.0}、3.5 μl 甲醛、10 μl 甲酰胺,置于 65℃ 水浴中 15 min,用冰浴冷却,加 2 μl 甲醛凝胶加样缓冲液 (50% 甘油, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.25% 溴酚蓝),在 1 $\times$ MOPS 配制的 0.9% 琼脂糖凝胶 (甲醛浓度为 2.2 mol/L) 上电泳分离 RNA,紫外光下照相,并测 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带到电泳原点的距离。将胶在 20 $\times$ SSC 中浸泡 45 min,以除去胶中的甲醛。按 Southern 印迹法将 RNA 转到硝酸纤维素膜上。80℃ 下烘烤 2 h。

为精确地测定 mRNA 的水平,取 10 μl 每种细胞 RNA,依次加入 10 μl 三蒸水、20 μl 甲酰胺、7 μl 37% 的甲醛和 2 μl 20 $\times$ SSC,于 68℃ 下温育 15 min,用冰浴冷却样品,加入 2 倍体积 20 $\times$ SSC。将每一样品分成两份,同时用狭缝点样器点在硝酸纤维素膜上^[4],室温下风干,80℃ 下烘烤 2 h。

1.4 探针的制备

人和鼠的 *hprt* cDNA 片段长度均为 1.2 Kb,用 Pst I 酶分别从 pDSK 1^[5] 和 pHPT 4^[6] 质粒上分离; β -actin cDNA 长为 590 bp,从 pA 2 质粒上用 Hind III 酶切分离。酶切片段用低熔点琼脂糖法回收。用随机引物试剂盒 (Promega) 以 α -³²P-dCTP 标记探针。用 Sephadex G-50 过柱分离标记好的探针,以 β 射线检测仪检 ³²P 吸收峰,取第一峰供杂交使用。

1.5 预杂交和杂交

配制预杂交液 (6 $\times$ SSC, pH 7.5, 5 $\times$ Denhard's, 0.5% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性鲑鱼精 DNA),按 0.2 ml/cm 膜面积配制。把印迹好的硝酸纤维素膜放在塑料袋内于 68℃ 水浴中振荡,预杂交 4 h。弃去预杂交液,加入含变性 DNA 探针的杂交液 (其它成分与预杂交液相同),杂交 24 h。室温下将膜依次置于 2 $\times$ SSC、0.5% SDS; 2 $\times$ SSC、0.1% SDS; 0.1 $\times$ SSC、0.5% SDS 溶液中于 37℃ 分别洗 5 min、15 min 和 30 min。然后在 0.1 $\times$ SSC、0.5% SDS 液中于 68℃ 下漂洗 10—30 min,并在室温下用 0.1 $\times$ SSC 漂洗 5 min。吸干水分,用保鲜膜包裹,于 -20℃ 下放射自显影 7 d。

1.6 狭缝杂交的数据处理

用 LKB 2202 ULTROSAN Leaser Densitometer 检测狭缝杂交图谱上各点的积分光密度值。以正常 CHO-K 1 的 *hprt* 基因 mRNA 光密度积分值为对照,计算突变细胞 *hprt* 基因 mRNA 转录的相对水平。为消除点样误差,用 β -actin 基因 mRNA 积分光密度为内参照,按下式计算突变细胞 *hprt* 基因 mRNA 转录的相对水平

mRNA 转录的相对水平 = $\frac{\text{突变细胞 mRNA 光密度积分} / \text{突变细胞 } \beta\text{-actin mRNA 光密度积分}}{\text{CHO-K1 mRNA 光密度积分} / \text{CHO-K1 细胞 } \beta\text{-actin mRNA 光密度积分}}$

2 实验结果

2.1 细胞总 RNA 的制备

采用 AGPC 一步法提取的细胞总 RNA, 经变性凝胶琼脂糖电泳显示 28S rRNA 和 18S rRNA 两条区带, 说明所提取的总 RNA 是完整的(见图 1)。

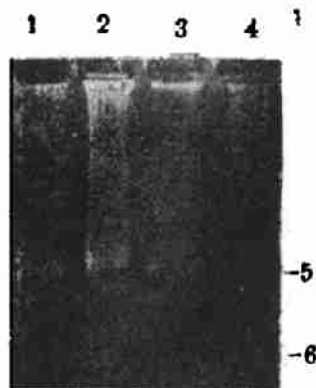


Fig 1. Electrophoresis of total RNA isolated from CHO-K1 and their mutants through 1.0% denaturing agarose gels (1) CHO-K1, (2) C-61, (3) C-62, (4) C-63, (5) 28S rRNA, (6) 18S rRNA

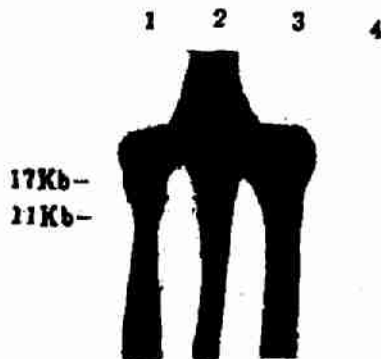


Fig 2. RFLPs of hprt gene of CHO-K1 and their mutants (1) CHO-K1, (2) C-61, (3) C-62, (4) C-63

2.2 辐射诱发的 CHO-K1 和 HeLa MR 突变细胞 hprt 基因限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析

2.2.1 CHO-K1 及其突变细胞 hprt 基因的 RFLP 比较 中国仓鼠细胞 hprt 基因总长度为 34 Kb, 正常 CHO-K1 细胞 DNA 经 EcoR I 酶切和分子杂交后显示 17 Kb 和 11 Kb^[7] 两条区带。而经 6 Gy γ 射线照射筛选得到的三个突变克隆(C-61、C-62 和 C-63)的 RFLP 都发生变化。其中 C-61

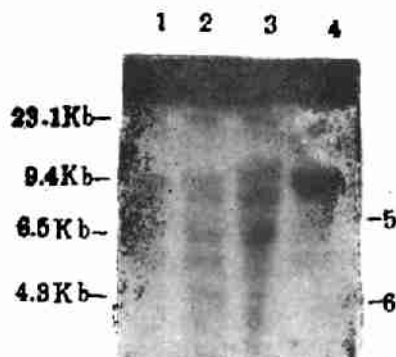


Fig 3. RFLPs of hprt gene of HeLa MR and their mutants (1) HeLa MR, (2) MR-1, (3) MR-1', (4) MR-4, (5) new band, (6) deletion

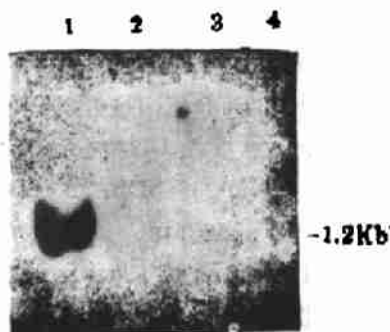


Fig 4. Northern blot analysis of hprt mRNA from CHO-K1 and their mutants (1) CHO-K1, (2) C-61, (3) C-62, (4) C-63

的 17 Kb 和 11 Kb 区带都消失而出现约 23 Kb 的新区带, C-62 缺失 11 Kb 区带, 而 C-63 的区带完全缺失。图 2 说明几个突变细胞都发生了 *hprt* 基因结构的改变, 具体表现为基因片段丢失或重排。

2.2.2 HeLa MR 及其突变细胞 *hprt* 基因的 RFLP 的比较 人细胞 *hprt* 基因的总长度为 44 Kb, HeLa MR 细胞 DNA 经 *Hind* III 酶切后与 *hprt* 探针杂交所得的杂交图谱显示 6 条杂交区带^[1], 实验检测到经 4 Gy γ 射线照射的突变细胞 MR-4 约 4.3 Kb 的区带缺失而出现约 7.0 Kb 的新带, 说明其 *hprt* 基因出现了重排现象(见图 3)。

2.3 辐射诱发的 CHO-K 1 突变细胞中 *hprt* 基因的表达

以中国仓鼠 *hprt* cDNA 为探针, 用 Northern 杂交分析 CHO-K 1 及其突变细胞的 mRNA 转录情况。正常 CHO-K 1 细胞中有 *hprt* 基因的转录, 而 3 个经 6 Gy γ 射线照射后筛选出的突变克隆未观察到 *hprt* 基因 mRNA 的转录(见图 4)。

为较准确地检测突变细胞中 *hprt* 基因的 mRNA 的转录水平, 采用狭缝杂交技术, 并用 β -actin 作内参照, 定量分析了 3 个突变细胞的 *hprt* 基因的表达水平。经计算三个突变细胞的 mRNA 转录水平分别只有 CHO-K 1 细胞的 4.96%, 4.29% 和 2.98%(见图 5)。

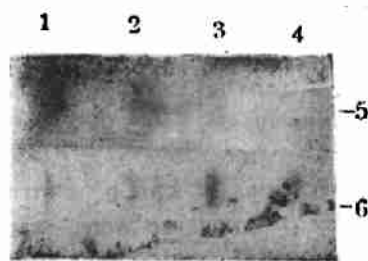


Fig 5. Slot blot analysis of *hprt* mRNA from CHO-K 1 and their mutants

(1) CHO-K 1, (2) C-61,

(3) C-62, (4) C-63

(5) *hprt* mRNA, (6) β -actin mRNA

3 讨 论

从 CHO-K 1 细胞的 Southern 杂交结果可以看出, 经 γ 射线诱变的三个突变细胞都发生 RFLP 的改变, 其中一株 *hprt* 基因完全缺失, 另二株部分缺失, 三个突变细胞 *hprt* 基因结构改变率为 100%。Morgan 等^[9]报道 CHO-K 1 细胞在 4 Gy γ 射线照后, *hprt* 基因 69% 完全缺失, 而照射剂量为 2 Gy 时, 只有 43% 发生完全缺失。说明照射剂量越高, *hprt* 发生 RFLP 改变的可能越大。本实验检测的三个

突变克隆的照射剂量均为 6 Gy, 高于文献所用的剂量, 因而均观察到缺失的现象, 初步说明电离辐射引起 *hprt* 基因结构的改变。

HeLa MR 细胞的三个突变细胞的照射剂量分别为 1 Gy、1 Gy 和 4 Gy, 实验只观察到经 4 Gy γ 射线诱变得到的突变细胞发生 RFLP 的改变。Berimer 等^[10]认为辐射引起人细胞有关基因的 RFLP 改变的可能性比鼠细胞要小, 但自发突变细胞中有关基因 RFLP 改变的可能性却比鼠细胞要大些。

从 CHO-K 1 及其突变细胞的 Northern 印迹结果可以看出, 三个突变细胞的 *hprt* mRNA 转录水平很低。更为精确的狭缝杂交分析的计算结果显示, 三个突变细胞的 mRNA 转录水平都低于对照 CHO-K 1 细胞的 5% 以下, 可认为是 *hprt* mRNA 转录缺陷细胞, 这与酶活分析结果基本上是一致的, 说明这些突变细胞 HPRT 酶活性的缺失是由于基因表达缺陷引起的。

本实验所观察的三个 γ 射线诱导的 CHO-K 1 突变细胞 *hprt* 基因的 RFLP 图谱都发生了变化, 而且缺失的片段都较大, 推测电离辐射造成的 *hprt* 基因结构改变, 是引起 mRNA 转录缺陷并进而导致 HPRT 酶活性缺失的主要原因。这可能是辐射致突的主要分子机理。

参 考 文 献

- 1 季守平等. 辐射研究与辐射工艺学报(待发表)。
- 2 Sambrook J et al. eds. *Molecular Cloning, USA*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd 1989, 931—937
- 3 Chomczynski et al. *Anal. Biochem.*, 1987, 162: 156
- 4 Sambrook J et al. eds. *Molecular Cloning. USA*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 753—757
- 5 Michelson A M et al. *PNAS. USA*. 1983, 80: 472
- 6 Konecki D et al. *Nucleic Acids Res.*, 1980, 10: 6763
- 7 Thacker J et al. *Mutat. Res.*, 1990, 232: 163
- 8 Whaley and Little. *Mutat Res.*, 1990, 345: 35
- 9 Morgan et al., *Mutat. Res.*, 1990, 232: 171
- 10 Berimer L H. *Brit. J. Cancer*, 1988, 57: 6

PRIMARY STUDY ON MOLECULAR MECHANISM OF γ -INDUCED hprt GENE MUTATION IN MAMMALIAN CELLS

Ji Shouping Fan Guocai Wu Ying Zhang Yangpei

(*Institute of Basic Medical Science, Beijing 100850*)

ABSTRACT By means of RFLPs method, the alterations of hprt gene structure in the mutant CHO-K1 and HeLa MR cells induced by γ - exposure were examined in order to study the molecular mechanism of gene mutation induced by ionizing radiation; expression of hprt gene in CHO-K1 mutant cells were also observed by Northern blot as well as slot blot. This experiment showed that ionizing radiation could result in hprt gene structure change which might lead to deficiency in mRNA transcription.

KEYWORDS Ionizing radiation, hprt gene, Mammalian cell, RFLPs

The project supported by National Natural Science Foundation of China