

参 考 文 献

- [1] Hayes M. A. and D. B. Pickering, 1985, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 80:345.
- [2] Hayes M. A., et al., 1984, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, 76:118.
- [3] Kurihara N., et al., 1984, *Pesti. Biochem. and Physiol.*, 21:63.
- [4] Stewart D. J. and T. Inaba, 1979, *Biochem. Pharmacol.*, 28:461.
- [5] Bock K. W., et al., 1976, *Biochem. Pharmacol.*, 25:2351.
- [6] Von Bahr C., et al., 1974, *Biochem. and Biophys. Res. Communi.*, 59(1):334.
- [7] Jacob S. T. and P. M. Bharava, 1962, *Exp. Cell Res.*, 27:453.
- [8] Rappaport C. and G. B. Howze, 1966, *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 121:1010.
- [9] Howard R. B. and A. K. Christensen et al., 1967, *J. Cell Biol.*, 35:675.
- [10] Berry M. N. and D. S. Friend, 1969, *J. Cell Biol.*, 43:506.
- [11] Wagle R. and W. R. Ingebretsen Jr., 1961, *Methods in Enzymology*, Vol.: 35: 579.
- [12] Seglen P. O., 1973, *Exp. Cell Res.*, 82: 391.
- [13] Fry J. R. and G. A. Jones et al., 1976, *Anal. Biochem.*, 71:741.
- [14] Nakatsugawa T. and L. B. William, et et., 1980, *Pesti. Biochem. and Physiol.*, 14:13.
- [15] 冷欣夫, 乔传令, 1986, 科学通报, 31(19):1505.
- [16] Jeejeebhoy K. N., et al., 1975, *Biochem. J.*, 164:141.

新技术介绍

原位缺口移位技术检测药物对细胞DNA的断裂损伤*

章静波 郝昌虎*

(中国医学科学院基础医学研究所细胞生物学室)

原位缺口移位技术, 又称为原位缺口翻译(In situ nick translation)是近几年建立起来的一种分子细胞生物学新方法。据作者所知, 国内尚未见有报道。现将其原理、技术操作程序及应用, 并结合我们的工作作一实用性地简要介绍, 以利国内尽早开展与运用起来。

一、原 理

缺口移位反应最早是 Kelly 等^[1]建立的, 原用来研究 DNA 体外复制的分子生物学方法。其后有人用来研究染色体^[2-4]、培养细胞与组织切片的 DNA 转录效力^[5,6]。其基本原理是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Escherichia coli DNA polymerase I) 可从一条 DNA 链缺口 (nick) 的

5' 端切除核苷酸, 同时从缺口的 3' 端连接核苷酸, 并依次顺序进行, 其结果切口沿 DNA 平移。因此, 新合成的数量可反映出 DNA 链的断裂, 即 DNA 受损的程度^[7,8]。至于原位缺口移位技术, 乃是将缺口移位技术与同位素放射自显术结合起来, 从而可在细胞核或染色体上反映出 DNA 受损的程度。因此, 一方面具有实感性, 便于观察记录。另一方面也可作半定量 (计数银颗粒) 或定量 (收集细胞作液

* 本文有关研究得到国家教委及加拿大不列颠哥伦比亚肿瘤研究中心 (British Columbia Cancer Research Centre) S.S. Tsang 博士科研基金资助, 部分工作在该实验室完成, 谨此致谢。

* 河南豫中制药厂。

闪测定)测定,其优点是显而易见的。在实用上又有外加 DNaseI 与不加 DNaseI 两种。前者主要用以区别有转录活性或潜在转录活性的染色质或基因与无转录活性的染色质或基因;而后者主要用于致癌物或辐射等因子对细胞 DNA 的断裂损伤作用。

二、实验程序

上面提到,本方法可用于研究染色体、细胞到组织切片中 DNA 损伤的程度,因此这三种标本在操作程序上略有差异,本文以培养细胞为例,并且不加 DNaseI 示范各个步骤。

1. 细胞培养及处理

实验可用正常细胞或恶性细胞,人体细胞或动物细胞,视实验目的而定。将细胞接种于预先放置有盖片(2.2×2.2 cm)的小号塑料培养皿内(3.4 cm)。每皿加入 2 ml 含适量血清与抗生素的培养基(常用 DME-M)。每皿的细胞总数为 3×10⁵ 个。将培养皿放入 37℃ 含 5% CO₂ 的孵箱内。24 小时后待细胞已很好地贴附在盖片上,吸去培养基,以不含血清的 DMEM 洗两次,加入 2 ml 不含血清的 DMEM 或含有一定浓度测试药物(如本文以 MNNG, 醋酸棉酚等为例)的 DMEM。

2. 细胞的固定

在经上述测试药物作用一定时间后,将盖片取出,以 PBS(pH 7.4)洗涮,清除细胞碎片等,然后用 3:1 的冰醋酸甲醇 Carnoy 液固定 15 分钟,待晾干后用树脂将上述附着有细胞的盖片固定于载片之一端,须记住的是,细胞面朝上。一天后树脂干涸,进行下一步的原位缺口移位反应。

3. 原位缺口移位反应

于上述盖片上,滴入 30 μl 缺口移位反应液使反应液淹没细胞,并以另一张清洁盖片覆盖其上,须注意不要有气泡,以确保反应液浸渍所有的细胞。为此要先准备混合液 A,然后再配制反应液。本文以制作 10 张标本为例,以示需配多少溶液。

① 混合液 A

500 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)	188 μl
50 mmol/L MgCl ₂	188 μl
100 mmol/L α-巯基乙醇	188 μl
10 mmol/L dATP	5.64 μl
10 mmol/L dGTP	5.64 μl

10 mmol/L dCTP	5.64 μl
10 mmol/L dTTP	5.64 μl
② 反应液	
混合液 A	96.3 μl
³ H-dTTP*	16 μl
大肠杆菌聚合酶 I(200 u/ml)	30 μl
BSA(2 mg/ml)	15 μl
双蒸水	145.4 μl

4. 终止反应

15 分钟后移去上覆的盖片,用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)洗涮数次,以洗去反应液,接着再以 95% 乙醇浸渍 30 分钟,晾干后(约 30 分钟),进行同位素放射自显术程序。

5. 同位素放射自显术

将上述经原位缺口移位反应的盖片在暗室内浸渍 Kodak 放射自显术乳胶(国内可用核Ⅳ乳胶——作者注),但乳胶应事先在 45℃ 中预温,通常可稀释 1 倍。略晾干后(约 30 分钟),置入装有干燥剂的密闭容器内,4℃ 曝光 3 天。

6. 显影与定影

可用一般放射自显术的显影剂与定影剂。这里我们推荐用 D 19 液,显影 5 分钟,定影 10 分钟,然后自来水漂洗 15 分钟。

7. 标本的染色

标本可用 Giemsa 染色。但我们的经验提示用地衣红(Orcein)为佳,其流程如下:

2% 地衣红(10 分钟)→水(数秒钟)→冰醋酸水混合液(1:1, 数秒钟)→95% 乙醇(1 分钟)→正丁醇(数秒钟)→正丁醇二甲苯混合液(1:1, 数秒钟)→二甲苯 I(数秒钟)→二甲苯 II(数秒钟)→树脂封片。

8. 观察与记录

在油镜下计数每个细胞核中的银颗粒数,同时减去相等面积的本底颗粒数,即为每个核中的真正银颗粒数。一般需随机取视野,共观察 100 个细胞,同时可作显微摄影记录。如作定量分析,则可收集细胞,进行液闪测定,各组互相比对。

三、应用例举及讨论

由于大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 对 DNA 缺口有剪除与连接核苷酸的能力,同时可将反应混合液中的核苷三磷酸来替代原来的核苷

* 若没有 ³H-dTTP, 也可用 ³H-TdR 代替。

酸^[7,8], 因此新合成的核苷酸量可反映出 DNA 链的损伤程度。本技术是在分子水平上反映遗传物质的改变, 因此其敏感性要比诸如检测染色体畸变、断裂、姊妹染色单体交换频率改变、微核形成以及碱洗脱与荧光分析法^[9,10]敏感得多。例如曾有人用此方法来检测紫外线诱发的 DNA 损伤^[6], 或者区别活性与非活性的染色质^[2,9]。最近 Anai^[10] 还将此技术应用于检测肿瘤细胞加温处理后的 DNA 损伤, 籍此为加温治疗方法提供理论依据。基于同样的原理, 1989 年 Libbus 等^[11] 用以研究青石棉 (crocidolite asbestos) 的致癌作用。由此可见该技术正得到日益广泛的应用。

我们曾用此方法比较正常人与毛细血管扩张性共济失调 (ataxia telangiectasia, A-T) 患者培养细胞对致癌物与诱变剂的反应。发现两种细胞对较高或低浓度 (10^{-2} — 10^{-3} mol/L) 的 MNNG 的反应相同, 但在低浓度 (10^{-3} mol/L) 的弱诱变剂没食子酸 (gallic acid) 的作用下, A-T 细胞中呈现有较多的银颗粒, 而正常细胞几乎无银粒出现。这一结果提示, 用原位缺口移位法可以证实 A-T 细胞比正常细胞易受到诱变剂的影响而发生遗传物质的改变 (将有另文详细报道)。此外, 我们也曾用此技术来检测两种男性节育药醋酸棉酚和雷公藤总甙 (GTW) 对 $C_3H_10T1/2$ 小鼠成纤维细胞 DNA 的作用, 其原因在于目前有关棉酚与 GTW 有否遗传毒性问题仍有不少争议^[12,13], 为此希望以原位缺口移位法来探讨它们对细胞 DNA 的作用。实验结果表明, 在较高浓度的醋酸棉酚或 GTW (2—3 μ g/ml) 作用 4 小时, 细胞核中显示的银颗粒多如作为阳性对照的 MNNG 组 (图版图 1, 2); 在中等浓度 (0.5—1 μ g/ml) 的作用下, 银颗粒显著地减少 (图版图 3, 4), 在低浓度 (0.1—0.3 μ g/ml) 的作用下, 细胞核中的

银颗粒与阴性对照组相同 (图版图 5, 6)。上述这些观察表明用原位缺口移位技术可以极好地反映出棉酚或 GTW 对 DNA 的损伤有剂量相关性以及该方法的敏感性。综上所述的所有结果, 我们认为原位缺口移位技术可运用于一切检测 DNA 损伤的实验。

摘 要

本文除简要地介绍了原位缺口移位技术的原理外, 详细地描述了其操作程序, 读者当可按此试用, 得到应有的结果。本文也例举并讨论了该技术的应用, 并指出这是当前分子细胞生物学方法的一项重要进展。

参 考 文 献

- [1] Kelly, R. B. et al., 1970, *J. Biol. Chem.*, 245:39—45.
- [2] Kerem, B. S. et al., 1983, *Nature (Lond)*, 304:88—90.
- [3] Bullerdick, J. et al., 1986, *Cytobios*, 45: 35—43.
- [4] Chandley, A. C. et al., 1987, *Cytogenet. Cell. Genet.*, 44:22—31.
- [5] Nose, K., et al., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111:383—389.
- [6] Iseki, S. 1983, *Cell. Biol. Int. Rep.*, 9: 471—477.
- [7] Sambrook, J. et al: *Molecular Cloning* 1989, P. 5. 35.
- [8] 施莱夫, RF. 温辛克, P. C 著, 章静波等译, 1985, 分子生物学实用方法, P. 151.
- [9] Dyer, K. A. et al., 1985, *Chromosoma (Berl)*, 92:209—213.
- [10] Anai, H. et al., 1988, *Cancer Lett.*, 40: 33—38.
- [11] Libbus, B. L., et al., 1989, *Cancer Res.*, 49:5713—5718.
- [12] 章静波, S.S.Tsang., 1990, 自然杂志, 13: 463—464.
- [13] Srivastava, A. K. et al., 1987, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 146:1515—1522.