

核分离-滤膜洗脱技术同时检测植物 DNA SSB 与 DSB

刘晓¹, 赵玉芳², 凌备备² (1. 中国科学院大连化学物理研究所生化工程室, 大连 116023, E-mail: Lixiao@dicp.ac.cn; 2. 浙江大学核农所, 杭州 310029)

摘要: 采用核分离-滤膜洗脱技术, 将分离的细胞核在微孔滤膜上裂解后相继用中性溶液和碱性溶液洗脱, 研究了⁶⁰Co- γ 辐射引发的大麦种胚细胞 DNA 断裂. 结果显示, 50Gy 的⁶⁰Co- γ 辐射主要引发 DNA 单链断裂(DNA SSB); 50~ 100 Gy 的辐射引发的 DNA 断裂包括单链断裂(SSB)与双链断裂(DSB); 当辐射剂量大于 100 Gy 时, DNA 断裂的增加部分则以 DSB 为主. 所用的实验方法适用于质地致密的植物材料并可在一次实验中同时检测 DNA 的 SSB 与 DSB, 为植物细胞的 DNA 链断裂作为生物标志物应用于环境诱变因子监测提供了基础.

关键词: DNA 链断裂; 核分离-微孔滤膜洗脱法; ⁶⁰Co- γ ; 辐射; 大麦; 生物标志物

中图分类号: X83; Q691.5; Q947.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2000)06-04-0042

A Nuclei Isolation-Filter Elution Assay for the Simultaneous Detection of DNA SSB and DSB of Compact Plant Donor

Liu Xiao¹, Zhao Yufang², Lin Beibei² (1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China E-mail: liuxiao@dicp.ac.cn; 2. Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Barley embryo DNA breaks in imbibing intact barley seeds induced by ⁶⁰Co- γ irradiation were studied by a nuclei isolation-filter elution assay, which permits the simultaneous detection of DNA double strand breaks (DSB) and single strand breaks (SSB) of compact plant donor. This assay based on the procedures of 4 h of neutral solution elution followed by 4 h of alkaline solution elution after lysing the free nuclei instead of intact cells by proteinase K on the 0.45 μ m pore-size filters. This approach offers a new kind of biomarker of DNA breakage in plant cells in the monitoring of mutagenic agent in the environment. The results indicated that when the barley seeds were exposed to different dosages of γ -ray, DNA breaks in embryo cells were induced in the following manner: (1) production mainly of SSB by 50Gy; (2) production of both SSB and DSB between 50 and 100Gy; and (3) production of DNA breaks with the increment in DSB by the dosage over 100Gy.

Keywords: DNA breaks; nuclei isolation-filter elution assay; ⁶⁰Co- γ ; radiation; barley; biomarker

DNA 链断裂及其修复的研究是揭示生命体突变机理的重要手段, 在辐射医学、致癌化合物的作用机理等研究中特别受重视, 但至今对植物材料的报道还很少, 且基本局限于 DNA 单链断裂(single strand break, SSB)及其修复的研究^[1, 2], 用结构致密的植物材料所做的研究工作则还基本未见报道, 原因在于现有检测方法难以克服植物细胞壁的机械屏障^[1, 3]. 笔者参考 Lu 等报道的滤膜洗脱技术^[4], 在原有研究

的基础上进一步改进洗脱方法, 建立了普遍适用于质地致密的植物材料并可在一次实验中同时检测 DNA 的单链断裂与双链断裂(double strand break, DSB)的核分离-微孔滤膜洗脱技术. 该技术克服了其它检测方法中普遍存在的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39470405)
作者简介: 刘晓(1965~), 女, 理学博士, 主要从事植物生理与分子生物学的研究, 现在中国科学院海洋研究所工作. (邮编: 266071).
收稿日期: 2000-01-14

DNA“SSB”信号中包含 DNA DSB 的缺点.

1 材料与方法

1.1 大麦种胚 DNA 标记及辐射处理

浙农大 3 号大麦种子在 $1.85 \times 10^5 \text{ Bq/ml}$ 的 $^3\text{H-TdR}$ (上海核技术开发公司, 比度 $1.2 \times 10^{12} \text{ Bq/mmol}$) 水溶液中于 26°C 避光吸涨 24h, 选取胚萌动状态一致的种子, 在 0°C 冰浴中用 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射处理, 剂量率 5 Gy/min . 每剂量 4 个重复, 各 30 颗种子.

1.2 细胞核分离

辐射后立即剥取麦胚并用匀浆法分离细胞核^[5].

1.3 DNA 链断裂检测操作程序

(1) 上样与淋洗 系统装置同文献^[6], 在 0°C 层析柜中将细胞核悬液加到微孔滤膜上, 用 $10\text{ ml } 0.15\text{ mol/L}$ 预冷的 NaCl 溶液淋洗以去除核外游离的 $^3\text{H-TdR}$.

(2) 细胞核裂解 取 2 ml 室温的裂解液 (新溶解的蛋白酶 K (GIBCO BRL 产品) 0.5 mg/ml , $\text{SDS } 1\%$, 甘氨酸 50 mmol/L , $\text{Tris } 50\text{ mmol/L}$, $\text{Na}_2\text{EDTA } 25\text{ mmol/L}$, $\text{pH } 10.0$) 直接加到膜的上方, 于 28°C 避光裂解 1 h .

(3) 洗脱 用中性洗脱液 ($\text{Na}_2\text{EDTA } 25\text{ mmol/L}$, $\text{Tris } 50\text{ mmol/L}$, 甘氨酸 50 mmol/L , $\text{SDS } 0.2\%$, $\text{pH } 10.0$) 以 1.8 ml/h 的流速洗脱 4.0 h , 此间流出的液体收集到 1 号收集容器中, DNA 双链断裂产生的片段将被洗脱下来. 然后用碱性洗脱液 ($\text{Na}_2\text{EDTA } 20\text{ mmol/L}$, $\text{SDS } 0.1\%$, 加 NaOH 至 $\text{pH } 13.0$) 以相同的流速洗脱 4.0 h , 收集到 2 号容器中, 得到 DNA 单链断裂产生的片段. 洗脱结束后洗脱器及管道中液体均收集到 3 号收集器中, 取下滤膜后用 4 ml 碱性洗脱液洗涤管道系统, 并入到 3 号收集器中, 通过称量容器在收集液体前后的重量确定洗脱物的体积.

(4) 洗脱产物的放射性强度测量 取 1 号收集器中液体 5.0 ml 置 50 ml 离心管中, 加入 3 mol/L 的 $\text{NaAc } 0.5\text{ ml}$ ($\text{pH } 4.8$) 与异丙醇 5.0 ml , 混匀后置 -20°C , 24 h 后于 4°C 、 $16\ 000$

r/min 离心 20 min , 沉淀用 70% 乙醇洗 1 次, 干燥后加入 5% $\text{TCA } 2.5\text{ ml}$, 于 90°C 水解 30 min , 冷却后取 0.5 ml 进行液闪测量, 由此计算中性可洗脱部分中 $^3\text{H-DNA}$ 的总量. 从每个 2 号与 3 号收集容器中取 2 份各 0.5 ml 置闪烁瓶中, 加入 1 mol/L 的 $\text{HCl } 100\mu\text{l}$. 滤膜置闪烁瓶中, 加入 1 mol/L 的 $\text{HCl } 0.5\text{ ml}$, 在 60°C 处理 3 h , 冷却后加入 5 mol/L 的 $\text{NaOH } 100\mu\text{l}$.

每闪烁瓶中加入闪烁液 ($\text{POPOP } 0.4\text{ g}$, $\text{PPO } 5\text{ g}$, 乙二醇乙醚 450 ml , 冰醋酸 8.8 ml , 二甲苯定容至 $1\ 000\text{ ml}$) 10 ml , 在 Packard 1900CA 双道液体闪烁计数器中用猝灭校正法测量 dpm 值. 按下述式子计算:

膜上 DNA 残留比 = $[F/(N + A + F)] \times 100\%$

DNA DSB = $[N/(N + A + F)] \times 100\%$

DNA SSB = $[A/(A + F)] \times 100\%$

DNA 单双链断裂比 = A/N

式中, N 为中性可洗脱部分 DNA 的总 dpm ; A 为碱性可洗脱部分的总 dpm ; F 为膜上残留即滤膜 dpm 与 3 号收集器中总 dpm 之和.

2 结果

2.1 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射诱发 DNA 链断裂的剂量效应

以洗脱结束时残留在滤膜上的 $^3\text{H-DNA}$ 占样本总 $^3\text{H-DNA}$ 的百分率 (即膜上 DNA 残留比) 作为衡量 DNA 链断裂 (包括 SSB 与 DSB) 的尺度, 残留比反映了细胞中不能被洗脱的 DNA (即未断裂 DNA) 的比率, 残留比数值小则 DNA 链断裂严重. 本实验 DNA 链断裂的含义与报道中 DNA SSB 的含义相同. 以不辐射对照组大麦种胚细胞的膜上残留比为 1, 其它各辐射处理组与之相比得到膜上相对剩留量. 以相对剩留量对辐射剂量作图, 得到图 1. 可见在 300 Gy 剂量范围内, 膜上相对剩留量随辐射剂量升高而下降, 下降速率随辐射剂量升高而减慢, 在 50 与 100 Gy 辐射条件下膜上残留比下降较迅速, 在 $100 \sim 300\text{ Gy}$ 剂量范围内, 下降幅度较小, 似向 0.25 的稳定值趋近, 表明 DNA 链的断裂有随辐射剂量升高而呈指数增加的趋

势, 该结果与动物细胞中得到的结果一致^[7,8].

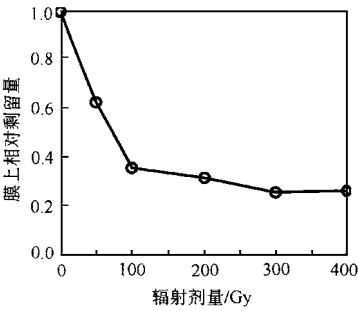


图1 ⁶⁰Co- γ 辐射对吸涨大麦种胚细胞 DNA 链断裂的剂量效应曲线

2.2 ⁶⁰Co- γ 辐射诱发 DNA SSB 的剂量效应

图 2 是扣除 DSB 后, DNA 中的 SSB 随辐射剂量的变化曲线. 由图 2 可见, 辐射导致大麦种胚细胞 DNA 产生 SSB 的量随剂量升高而增加, 其中 50Gy 辐射即可导致 DNA 产生显著的 SSB, 使 DNA SSB 增加到对照的 1.39 倍, 100Gy 的 ⁶⁰Co- γ 辐射则使 DNA SSB 增加到对照的 1.52 倍, 但此后, 随辐射剂量进一步升高, DNA SSB 不再显著增加. 本结果与小鼠白血病细胞在 X 射线辐射后, 其扣除 DSB 后 DNA 中 SSB 随剂量的变化曲线趋势一致^[4].

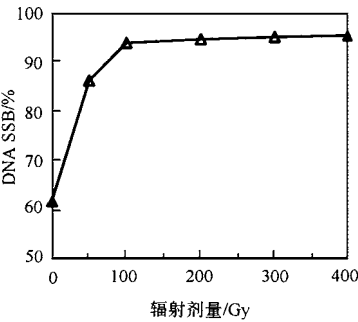


图2 ⁶⁰Co- γ 辐射对吸涨大麦种胚细胞 DNA SSB 的剂量效应曲线

2.3 ⁶⁰Co- γ 辐射诱发 DNA DSB 的剂量效应

⁶⁰Co- γ 辐射诱发大麦种胚 DNA DSB 的基本规律如图 3 所示. 由图 3 可见, 在 300Gy 剂量范围内, DNA DSB 随剂量的变化基本上有线性增长的关系, 其中 100Gy 与 300Gy 辐射处

理分别使大麦种胚细胞的 DNA DSB 增加到对照的 1.27 与 1.66 倍. 该结果与碳离子辐射诱导小鼠黑色素瘤细胞的 DNA DSB 随辐射剂量呈线性增长的变化趋势一致^[9]. 但当剂量进一步升高到 400Gy 后 DSB 数值反而下降.

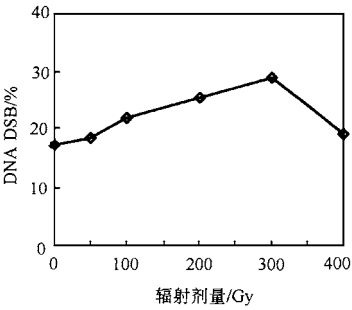


图3 ⁶⁰Co- γ 辐射对吸涨大麦种胚细胞 DNA DSB 的剂量效应曲线

大麦种胚 DNA 单双链断裂之比值与⁶⁰Co- γ 辐射剂量之间的关系见表 1. 由表 1 可见, DNA SSB 与 DNA DSB 的比值随辐射剂量的升高而下降, 表明随辐射剂量升高 DNA DSB 在 DNA 断裂中所占的权重逐渐增加.

表 1 不同剂量⁶⁰Co- γ 辐射下大麦种胚细胞 DNA SSB 与 DNA DSB 的比值

辐射剂量/Gy	0	50	100	200	300
单双链断裂比	3.97	3.91	3.31	2.75	2.33

3 讨论

通过比较图 1~ 3 可知, 在⁶⁰Co- γ 辐射下, 大麦种胚细胞 DNA 链断裂的发生有如下规律: 在 50Gy 左右的低剂量辐射条件下⁶⁰Co- γ 辐射主要引发 DNA SSB, 在 50~ 100Gy 的辐射条件下 DNA 链断裂的增加部分由 SSB 与 DSB 的增量共同构成, 高于 100Gy 的辐射条件下 DNA 链断裂的增加部分主要是 DSB 的贡献.

电离辐射、化学诱变剂等环境因素均可引起 DNA 分子发生断裂, 在正常的生物体内, DNA 单链断裂多数可得到有效的修复, 因而不

具有非常重要的生物学意义,而突变、畸变、死亡等生物学事件主要是 DNA 双链断裂的结果^[10],因此分别检测 DNA 的 SSB 与 DSB 对基础理论研究有重要意义.本文的结果表明,通过所用的实验方法可检测得到将 DNA DSB 排除在外的 DNA SSB,为分别检测植物样本的 DNA SSB 和 DNA DSB 提供了检测手段.

用 DNA 链断裂作为生物标志物能快速地指示环境中诱变因子的存在,已有提议将 DNA 链断裂作为人类接触诱变因子的生物标志物^[11].本文所用的检测方法适用于质地致密的植物样本,这为将植物细胞的 DNA 链断裂作为生物标志物应用于环境监测之中提供了良好的基础.如果使用 DAPI、EB 等 DNA 的特异性荧光标记物替代放射性同位素标志,则本方法还可用于难以进行放射性标记的生物材料,如 DNA 复制能力较弱的成熟组织,如此可使该检测技术的应用范围大为增加.

DNA DSB 数值在 400Gy 的高剂量辐射下出现大幅度的下降,该现象可能是因过高剂量的辐射破坏了细胞核的完整性从而使损伤过重的细胞核在洗脱前的操作中被去除所致,因为笔者用流式细胞仪分析时曾观察到从高剂量辐射处理的大麦种胚中分离的细胞核样本中存在大量的细胞核碎片*.实验中 DNA SSB 本底较高,推测与供试材料正处于 DNA 复制的第一个高峰期^[12,13]有关,预计使用非快速生长的材料可克服该现象.

致谢:感谢浙江大学农学系丁守仁教授为本研究提供了大麦种子.

参考文献:

1 Britt A B. DNA damage and repair in plant. *Annu Rev.*

Plant Physiol Plant Mol. Biol., 1996, **47**: 75~ 100.

- 2 Shikazono N, Watanabe H, Tanaka A et al. Reduced rejoining ability of DNA strand breaks with differentiation in barley root cells. *Mutat Res.*, 1995, **337**: 41~ 48.
- 3 Shikazono N, Watanabe H, Tanaka A et al. Detection of DNA strand breaks in barley roots after γ -ray irradiation using the alkaline unwinding assay. *J Radiat Res.*, 1994, **35**: 35~ 40.
- 4 Lu J X, Kaecck M R, Jiang C et al. A filter elution assay for the simultaneous detection of DNA double and single strand breaks. *Anal. Biochem.*, 1996, **235**: 227~ 233.
- 5 白永延,唐惕,曹湘玲等.分离的蚕豆细胞核的 RNA 聚合酶活力的研究. *实验生物学报*, 1981, **14**(1): 43~ 47.
- 6 刘晓.核分离-中性微孔滤膜洗脱法检测大麦种胚细胞核 DNA DSB. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 1999, **25**(4): 357~ 360.
- 7 Warters R L, Barrows L R, Chen D J. DNA double strand break repair in two radiation-sensitive mouse mammary carcinoma cell lines. *Mutat Res.*, 1995, **336**: 1~ 7.
- 8 Koch C J, Giandomenico A R. The alkaline elution technique for measuring DNA single strand breaks: Increased reliability and sensitivity. *Anal Biochem.*, 1994, **220**: 58~ 65.
- 9 周光明,卫增泉,李文建等.碳离子诱导的 DNA 双链断裂. *生物物理学报*, 1998, **14**: 145~ 149.
- 10 陈去恶,罗祖玉.细胞对损伤 DNA 的修复.见:朱壬葆等编. *辐射生物学*.北京:科学出版社,1987. 254~ 332.
- 11 唐国慧,庄志雄,李劲松等. DNA 链断裂作为石棉接触的生物标志物的研究. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1997, **15**(4): 218~ 220.
- 12 赵玉芳,凌备备,林晓霞. γ 辐照对吸胀大麦种胚 DNA 非预定合成与复制合成的影响. *核农学报*, 1995, **9**(2): 65~ 69.
- 13 刘晓,赵玉芳,凌备备.电子束辐射对大麦种胚核酸合成活性的损伤效应. *植物生理学报*, 2000, **26**(3): 252~ 256

* 刘晓.电子束与⁶⁰Co- γ 射线对各物种胚作用的分子放射生物学研究. *浙江农业大学博士论文集*, 1998, 89~ 107.