

CHL 细胞 DNA 解螺旋荧光分析法实验参数的选择及其应用

薛丽君 金中初

浙江医学大学病理生理教研室 杭州 310031

摘要 为确定 CHL 细胞为测试靶细胞时 FADU 的较佳实验参数,采用变化解旋温度及解旋液碱浓度,并根据 Birnboim 等的判断标准,结果表明解旋温度先 0-30min 后 15-60min;解旋液 NaOH 浓度 0.4N 效果较佳。并以此为条件把该法应用于检测过氧化氢(H₂O₂)诱导的 DNA 过氧化损伤-适应及抗过氧化作用,结果证明了所选用参数的可靠性。

关键词 CHL 细胞;DNA 解螺旋荧光分析法;解旋温度;解旋液碱浓度;过氧化适应;抗过氧化

THE SELECTION AND THE APPLICATION OF EXPERIMENTAL PARAMETERS ABOUT FLUORIMETRY ASSAY OF DNA UNWINDING ON CHL CELLS

Xue Lijun, Jin Zhongchu

Dept. of Pathophysiology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031

Abstract To make certain stable experimental parameters about FADU in detection of CHL DNA breaks, temperature of DNA unwinding and concentration of unwinding alkaline solution NaOH were modified through FADU on CHL cells. According to Birnboim's criterion, unwinding temperature first 0-30 min then 5-60 min and NaOH 0.4N were selected as better conditions. The reliability of these experimental parameters was established by detection of peroxidative adaptive response and antiperoxidation on CHL DNA breaks induced by H₂O₂ with the improved FADU.

Key words CHL cells; FADU; temperature of unwinding; concentration of unwinding alkaline solution; peroxidative adaptation; antiperoxidation

Birnboim 等人利用淋巴细胞染色质 DNA 对碱的稳定性及 DNA 断裂可使解螺旋加快的原理和溴化乙啶可稳定地嵌入双链 DNA 的特性建立了检测 DNA 断裂的 DNA 解螺旋荧光分析法(FADU),但不同种属动物或不同脏器细胞的 DNA 解螺旋速度有所不同,所以

在采用 FADU 做为检测 CHL 细胞 DNA 断裂的方法时,应先研究以该细胞做为测试靶细胞时 FADU 的较佳实验参数,并以此为条件把该法应用于检测氧化剂诱导的 DNA 过氧化损伤-适应及抗过氧化作用。

材料和方法

1 细胞系 中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL)用含 15%灭活小牛血清的 EMEM(Gibco)培养液在 5%CO₂、饱和温度及 37℃ 条件下培养。

2 化学试剂 过氧化氢(H₂O₂)为浙江临安化工厂产品;内消旋肌醇购自中国政翔化学研究所;巯基乙醇为上海化学试剂总厂所属上海试剂四厂产品。褪黑激素(MT)购自美国 sigma 公司。

3 FADU 反应液 所用的 B、C、D、E、G 液配方参见文献⁽¹⁾

4 FADU 实验步骤和 DNA 链断裂水平的表达

4.1 实验步骤 实验设 T 组、B 组、空白对照(OD₀)及 H₂O₂ 处理组(OD_C),各处理组细胞加相应浓度的 H₂O₂ 1ml,空白对照组加 1ml 0.01mol/l PBS 于 37℃ 同步培养 30 分钟,T、B 组不作处理,各组细胞分别用冷 PBS 液洗涤二遍,最终以 B 液悬起,细胞浓度调整为 10⁵ - 10⁶/ml。FADU 的具体操作步骤参见⁽¹⁾

4.2 DNA 链断裂水平的表达 解螺旋后双链 DNA 的剩余率(OD%)反映 DNA 链断裂水平,OD%值按下式计算:

$$OD = (OD_P - OD_B) / (OD_T - OD_B) \times 100\%$$

T 组荧光强度(OD_T 值)代表反应体系中的总荧光,B 组荧光强度(OD_B 值)代表体系中双链 DNA 以外所有其它物质的荧光量。OD_T 减去 OD_B 代表体系中原有双链 DNA 荧光量。P 组的荧光强度(OD_P)代表对照组或处理组解螺旋后的剩余荧光量(OD₀ or OD_C)。OD₀ 减去 OD_B 或 OD_C 减去 OD_B 代表解螺旋后剩余双链 DNA 的荧光量。

DNA 断裂剂造成 OD 值的减少,反之断裂抑制剂使 OD 值上升。在同一试验系统里,OD_T、OD_B 是不变的,OD 值仅与 OD_P 值有关,因此 OD = OD_P,即各处理组的 OD 值可直接

用 OD_C 或 OD₀ 来表示 DNA 断裂水平。

5 参数选择标准 按照 Birnboim 等⁽²⁾的观点,最佳实验参数的选择应综合考虑 OD 值、OD₀ 值(空白对照组 OD 值)和 OD_T/OD_B 比值,在保持 OD 值较大的前提下兼顾 OD₀ 值和 OD_T/OD_B 比值。

6 适应一攻击和抗氧化实验程序

6.1 适应一攻击实验程序 根据剂量效应关系,确定适应与攻击剂量

细胞接种后 24hr,不同浓度 H₂O₂ 预处理 1hr,换新鲜培养液培养 24hr,加较高浓度 H₂O₂ 攻击 30min,同时设空白对照,预处理对照及攻击对照,用 FADU 法测荧光强度,方法和 DNA 断裂水平表达同上。

6.2 抗氧化实验程序 程序基本同适应一攻击实验程序,不同之处为不同浓度抗氧化剂预处理 30min

7 统计处理 采用 SPSS 及 STATISTIC 软件包分析数据,两组计量资料比较以 t 检验,多组计量资料比较采用方差分析。

结果与讨论

1 FADU 的实验条件

DNA 解螺旋的主要影响因素有解旋液 NaOH 浓度,解旋温度,在 CHL 细胞,这两种因素的影响结果见表 1、表 2。结果表明 DNA 在解旋液 NaOH 浓度为 0.4N 时所得的 OD 值,OD₀ 值均优于解旋液 0.2N NaOH。但 OD_T/OD_B 比值后者优于前者;DNA 在 15℃ 解螺旋所得的 OD 值,OD₀ 值均优于 0℃ 解螺旋,但 OD_T/OD_B 比值后者优于前者。按前述最佳实验参数标准综合考虑,解旋液 NaOH 浓度以 0.4N 为好;解旋温度以先 0℃ 30min,后 15℃ 60min 比持续 0℃ 解旋 90min 为好,因此采用解旋液 NaOH 浓度 0.4N,解旋温度先 0℃ 30min,后 15℃ 60min 作为 FADU 在 CHL 上的实验条件。

Table 1 Results Affected by NaOH Concentration in Unwinding Solution

NaOH (N)	OD _T /OD _B	OD _O (%)	H ₂ O ₂	Treatment	
			OD($\bar{x} \pm s$)	OD(%)	OD(%)
0.2N	1.328	56.01	6.747 ±0.096	40.35	15.66
0.4N	1.247	62.20	7.772 ±0.341	34.63	27.57

unwinding time: 1 hour, unwinding temperature: 0 ;
H₂O₂ concentration: 5000umol/L ;

Table 2 Results Affected by DNA Unwinding Temperature

Unwinding Temperature	OD _T /OD _B	OD _O (%)	H ₂ O ₂	Treatment	
			OD($\bar{x} \pm s$)	OD(%)	OD(%)
15	1.399	69.26	5.621 ±0.192	10.74	58.51
0	1.500	45.25	5.456 ±0.071	4.32	40.93

unwinding alkaline solution NaOH concentration: 0.4N ;
unwinding time: 90 minutes; H₂O₂ Concentration: 5000 umol/L

2 H₂O₂ 浓度与 DNA 断裂的剂量效应关系

H₂O₂ 浓度在 0 - 5μmol/L 之间,OD 值随浓度增加轻微下降,5 - 500 μmol/L 之间呈近似水平变化,超过 500 μmol/L 之后,随着浓度的增加,OD 值迅速下降,因此,适应 - 攻击实

验中预处理剂量可选用小于 500 μmol/L 的浓度,适应 - 攻击实验及抗氧化实验中攻击剂量可选用 5000μmol/L 左右的浓度。在 0 - 5000 μmol/L 之间,总的趋势为 OD 值随剂量的增加而下降。剂量效应关系见图 1。

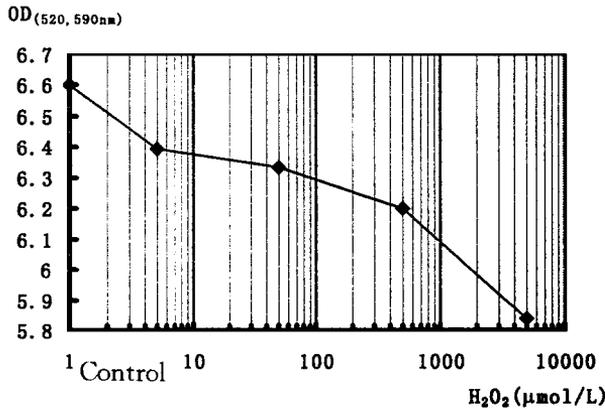


Figure 1 DNA Strand Breaks in CHL Cells Treated with H₂O₂ by FADU

3 DNA 断裂水平的过氧化适应反应及抗氧化作用

把经标准化选定实验参数的 FADU 法在 CHL 细胞上用于过氧化损伤 - 适应和抗氧化实验证明,一定浓度范围内(5 - 50μmol/L)的 H₂O₂ 诱导的过氧化适应反应能明显抑制高浓

度 H₂O₂ (5000μmol/L) 所致的 DNA 断裂,而且随着预处理剂量的增加,预测值与实测值间距有增大的趋势(1.130 < 1.406 < 2.101),表明适应程度存在一定剂量效应关系;同样也证明了褪黑激素(Melatonin, MT)在 DNA 断裂水平上的抗氧化作用,见表 3 和表 4。

Table 3 The Effects of Low-Level H₂O₂ Pretreatment on DNA Breaks Induced by 5000 μmol/L H₂O₂ in CHL Cells

Conditioning Pretreatment H ₂ O ₂ (μmol/L)	Challenging Treatment H ₂ O ₂ (μmol/L)	Observed OD _(520,590)	Expected _a OD _(520,590)
0	0	6.271 ±0.671	-
5	0	6.305 ±0.730	-
25	0	5.265 ±0.261	-
50	0	5.730 ±0.967	-
0	5 000	3.227 ±0.326	3.227
5	5 000	4.391 ±0.170 *	3.261
25	5 000	3.627 ±0.003 *	2.221
50	5 000	4.792 ±0.151 *	2.691

a. sum of two individual treatment minus the control

* vs expected $P < 0.05$

Table 4 The Effects of MT Pretreatment on DNA Breaks Induced by 5000μmol/L H₂O₂ in CHL Cells

Groups	Observed OD (O)	Expected _a OD (E)	O - E	(O - E) / O (%)
control	8.286 ±0.280	-	-	-
H ₂ O ₂	6.419 ±0.107	-	-	-
MT(0.5μmmol/L) + H ₂ O ₂	7.001 ±0.246	5.46	1.541	22.01
MT(1μmmol/L) + H ₂ O ₂	7.389 ±0.618 *	5.584	1.805	24.43
MT(2μmmol/L) + H ₂ O ₂	8.060 ±0.395 *	5.457	2.603	32.30
DMSO(1μmmol/L) + H ₂ O ₂	8.352 ±0.856 *	5.702	2.65	31.73

a. sum of two individual treatment minus the control

* vs Guoup H₂O₂ $P < 0.05$

H₂O₂ 易引起 DNA 单、双链断裂,并以单链断裂为主⁽³⁾。

Birnboim⁽²⁾等人利用染色质 DNA 对碱的稳定性及 DNA 断裂可使解螺旋加快的原理和溴化乙啶可稳定地嵌入双链 DNA 的特性建立了 DNA 断裂的荧光测定法,该法不需同位素标记,因而可排除射线照射影响 H₂O₂ 的适应性反应⁽⁴⁾,比起最常用的 DNA 断裂测定法——羟基磷灰石吸附法等具有明显的优点,并且简便、快捷、灵敏,比 UDS 试验最低检出浓度低一个数量级⁽¹⁾,是研究低剂量 H₂O₂ 对 DNA 断裂影响的较理想方法。该法曾用于淋巴细胞等的 DNA 断裂检测^(1,2)。本研究所用的细胞不同,因此我们建立的测定条件(解旋液 NaOH 浓度 0.4N;解旋温度先 0 30min,后 15 60min)较适宜于本实验所用细胞

CHL。通过在过氧化损伤 - 适应和抗氧化方面的应用,证明了选用的 FADU 参数的可靠性和扩大了该方法的应用范围。

参考文献

- 1 杨业鹏,徐厚恩,南新升.快速检测 DNA 链断裂的 DNA 解螺旋荧光分析法.卫生毒理学杂志,1994;8(2):118
- 2 Birnboim HC, Jevcak JJ. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res*, 1981;41:1889
- 3 Cantoni O, Sestili P and Guidarelli A. Cytotoxic impact of DNA single vs double strand breaks in oxidatively injured cells. *Arch Toxicol Suppl*, 1996;18:223
- 4 孟庆勇,姜杰,蔡露,等.化学物质与电离辐射之间的交叉适应性反应.中华放射医学与防护杂志,1995;15(5):298