

MNNG 诱导猴肾 vero 细胞中的非定标性突变^①

张小山 余应年 陈星若

浙江医科大学病理生理学教研室及医学分子生物学实验室 杭州 310031

摘要 本研究用甲基硝基亚硝胍(MNNG)单独处理猴肾细胞后移去残余的诱变剂,然后将穿梭质粒 pZ189(含有靶基因 supF tRNA 基因)引入细胞中复制,并在大肠杆菌 MBM7070 中筛选突变子。结果显示:0.2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG 处理组的突变频率较自发突变频率增加了 3.1 倍,而 0.2 和 2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG 处理组点突变频率分别为 12.2×10^{-4} (43/35376)和 6.2×10^{-4} (22/35712),比自发点突变频率 2.1×10^{-4} (10/47741)分别增加了 5.8 倍和 2.9 倍,其卡方检验的 P 值均小于 0.01。本研究首次证实了哺乳类细胞中存在着非定标性突变。

关键词 非定标性突变;甲基硝基亚硝胍;穿梭质粒

NONTARGETED MUTAGENESIS IN MONKEY KIDNEY VERO CELLS INDUCED BY MNNG

Zhang Xiaoshan, Yu Yingnian, Chen Xingruo

Department of Pathophysiology, and Laboratory of Medical Molecular Biology,
Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031

Abstract The intact pZ189 DNA were introduced into monkey kidney vero cells to replicate, which had been pretreated with N-menthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). The mutants were selected in *E.coli* MBM7070. The results showed that mutation frequency in the 0.2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG pretreated cells increased by 3.1 times over the spontaneous mutation frequency. The scored point mutation frequencies were 12.2×10^{-4} (43/35376) and 6.2×10^{-4} (22/35712) in 0.2 and 2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG pretreated cells respectively. Thus 5.8 and 2.9-fold increases in point mutation frequencies were found when compared with the spontaneous mutation frequency of 2.1×10^{-4} (10/47741). Statistical analysis showed that the difference was significant($P < 0.01$). This experiment demonstrate that nontargeted mutagenesis exists in mammalian cells.

^① 国家和省自然科学基金资助项目

Key words nontargeted mutation; MNNG; shuttle plasmid

非定标性突变(nontargeted mutation)与定标性突变(targeted mutation)不同,前者发生在未遭受外源 DNA 损伤因子攻击的部位。非定标性突变为原核细胞中 SOS 反应的重要现象之一,其发生机制被认为是 DNA 损伤诱导了 1 种易误性 DNA 聚合酶⁽¹⁾。用病毒或重组质粒作为探针在哺乳类细胞中已观察到了增强突变形成(enhanced mutagenesis)和增强再活(enhanced reactivation)现象^(2,3)。但哺乳类细胞中的非定标性突变形成却一直未被证实。哺乳类细胞中 SOS 反应,尤其是非定标性突变形成对于人类肿瘤及遗传性疾病的发生,以及生物进化等可能都有未被揭示的重要作用。哺乳类细胞中研究突变形成的 1 种有用的系统——穿梭质粒系统的建立和发展,使我们有可能对非定标性突变形成进行详细、深入地研究。本研究利用穿梭质粒的特殊性质作了以下特殊设计以观察哺乳类细胞中是否也有非定标性突变,即用短寿致突变物处理宿主细胞后,再将健全的质粒 pZ189 引入细胞中复制,这样在质粒 DNA 中所观察到的突变现象,就可排除致突物直接损伤质粒 DNA 后诱发突变

的可能性,从而阐明非定标性突变的形成,并可用于探讨非定标性突变形成的机制。

材料和方法

1. 材料 哺乳类细胞为非洲绿猴肾 vero 细胞,指示菌 *E.coli* MBM7070 (F-LacZ(Am) CA7020, LacY1 hsdR hsdM: Δ (araABC leu) 7679 galU galK rpsL thi)及穿梭质粒 pZ189(结构见图 1)系美国 Otsuka 制药有限公司 Scidman 博士赠送。当 pZ189 转化大肠杆菌 MBM7070 后,质粒中 supF tRNA 基因编码的 tRNA 可携带酪氨酸,其反密码子可识别 LacZ 基因中编码酪氨酸密码子中的琥珀突变在转录后形成的终止密码,从而使宿主菌 MBM7070 产生 β -半乳糖苷酶,可在含有 β -半乳糖苷酶的底物 5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-半乳糖苷(X-gal)和 LacZ 操纵子的诱导物异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的指示平板上呈现兰色菌落。supF tRNA 基因有突变时,菌落呈浅兰色或白色⁽⁴⁾。

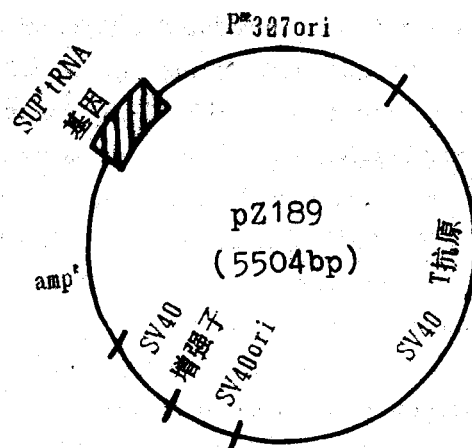


图 1 pZ189 结构示意图

2. 方法

2.1 质粒制备 用碱变性法制备穿梭质粒 pZ189 DNA⁽⁵⁾, 纯度要求 OD260/OD280 大于 1.80.

2.2 MNNG 处理细胞 vero 细胞在 DMEM 培养基(含小牛血清 15ml/dl, 青霉素 200u/ml, 链霉素 100 μ g/ml, 卡那霉素 200 μ g/ml)中生长 24h 后, 用 Hanks 液洗 2 遍, 然后以含 0、0.2、2 及 20 μ mol/L MNNG 的 DMEM 处理细胞 2.5h, 经 Hanks 液洗 2 遍后继续培养 24h.

2.3 细胞转染 用 DEAD-葡聚糖方法将 pZ189 质粒转染 vero 细胞⁽⁶⁾. 上述细胞经 PBS 液(pH7.4)洗 2 遍和 TBS-D 液(含 0.1g/gl)葡萄糖的 Tris 缓冲盐溶液 pH7.4)洗 1 遍后, 用 0.3ml 含 pZ189 质粒 DNA 6.7 μ g/ml, DEAE 葡聚糖 1mg/ml 的 TBS-D 溶液, 在 37 $^{\circ}$ C 下处理 40min. 细胞用 TBS-D 溶液洗 2 遍和 PBS 溶液洗 1 遍后, 用含 100 μ mol/L 氯喹的 DMEM(含 15%小牛血清)37 $^{\circ}$ C 处理细胞 4h, 再用 TBS-D 溶液洗 2 遍和 DMEM 洗 1 遍, 然后加全培养基培养 48h.

2.4 从细胞中提取质粒 DNA 用 Hirt 方法提取细胞中的质粒 DNA⁽⁷⁾.

2.5 Dpn I 内切酶处理 向从细胞中回收的质粒 DNA 溶液 20 μ l 中依次加入 Dpn I 内切酶制剂(1u/ μ l)1 μ l 和 10xDpnI 缓冲液 2.4 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 2h, 以切除未在细胞中复制的质粒. 因宿主 *E.coli* MBM7070 为 dam⁺, dam 酶可使在细菌中复制的质粒发生甲基化改变, 而形成多个 DpnI 酶切位点, 质粒在细胞中复制后, DpnI 酶切位点消失⁽⁸⁾.

2.6 细菌转化 用氯化钙方法将经 DpnI 处理过的 pZ189 质粒 DNA 转化 *E.coli* MBM7070⁽⁹⁾.

2.7 细菌转化子克隆计数及突变子筛

选 用自动菌落计数仪(Artek counter 880, 美国)和手工计数转化子菌落总数. 挑取白色或浅兰色的菌落划线接种于指示平板上进行培养. 每个突变菌落至少划皿 2 次以确定突变子.

2.8 琼脂糖凝胶电泳筛选突变子 用碱变性法小量制备突变子质粒 DNA 并取样在 1%琼脂糖凝胶电泳约 12h, 经溴乙锭后染色并拍照以观察电泳迁移率改变.

结 果

1. DpnI 对未在细胞中复制过的 pZ189 质粒的酶切效率 为证实 DpnI 内切酶在本实验系统中的酶切效率, 我们将 vero 细胞用同样的实验方法破膜(Hirt 法), 纯化得到细胞溶解物, 并向细胞溶解物中加入从细菌中制备的 pZ189 质粒 DNA, 再加入 DpnI 内切酶处理, 转化 *E.coli* MBM7070 后计数细菌克隆数. 结果(表 1)示: DpnI 的酶切效率在 99% 以上.

表 1 DpnI 对 pZ189 的酶切效率

	细菌克隆数(个)
0.25 μ g 质粒 DNA+DpnI	3
0.25 μ g 质粒 DNA	> 1000
0.25 μ g 质粒 DNA+DpnI	10
0.25 μ g 质粒 DNA	> 200 $^{\circ}$

2. 突变频率 如表 2 所示: 我们已经分离到 107 个突变子, 其中 24 个是在未经 MNNG 处理的细胞中所获得, 即自发产生的突变子. 0.2 和 2 μ mol/L MNNG 浓度的 vero 细胞中, 分别获得了 55 个和 28 个突变子. 20 μ mol/L 浓度 MNNG 处理组可能由于 MNNG 的毒性作用导致不能从细胞中回收到足够量的 DNA 以获得足够的细胞转化克隆进行突变子筛选. 突变子中, 有 1 部分是以浅兰色菌落得到选择的. 这样的菌落在自发突变中有 4 个, 而

MNNG 处理细胞中获得的突变子中有 11 个, 分别占各自突变子总数的 16.7% 和 13.3%。自发突变及 0.2、2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG 处理组的突变频率分别为 5×10^{-4} (24/47741)、 15.5×10^{-4} (55/35376) 和 7.8×10^{-4} (28/35712)。其中 0.2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG 处理组的突变频率与自发突变频率的卡方检验显示差别有显著性意义 ($P < 0.01$)。

表 2 MNNG 预处理的 vero 细胞中 supF tRNA 基因的突变频率*

MNNG ($\mu\text{mol/L}$)	转化子 (个)	突变子 (个)	突变频率 ($\times 10^4$)
0	47741	24	5.0
0.2	35376	55	15.5**
2	35712	28	7.8***
20	659	0	

* 0、0.2 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 组为 4 次转染的结果, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组为 1 次转染的结果

** $P < 0.01$

*** $P = 0.1393$

3. 点突变频率 用穿梭质粒研究自发突变的资料表明: 突变子中含有相当多的缺失、插入等重排的改变⁽¹⁰⁾。我们将从突变子中提纯的质粒 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 以观察其电泳迁移率的改变 (见图 2.1 和图 2.2); 同时将与对照 pZ189 质粒的电泳迁移率一致的突变子当作在 supF 基因中仅仅发生了点突变改变 (仍有可能含有一些小的缺失、插入), 并以点突变频率作为实验中的观察指标。结果如表 3 所示: 在自发突变及 0.2、2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG 浓度处理的 vero 细胞中所获得的突变子中, 其质粒 DNA 电泳迁移率发生改变的突变子数分别为 14 个、12 个、6 个, 分别在各自的突变总数中占 58%、22%、21%。点突变频率分别为 2.1×10^{-4} 、 12.2×10^{-4} 和 6.2×10^{-4} 。卡方检验显示: 0.2 及 2 $\mu\text{mol/L}$ MNNG 处理组的点突变频率与自发点突变频率的差别均有显著性意义。

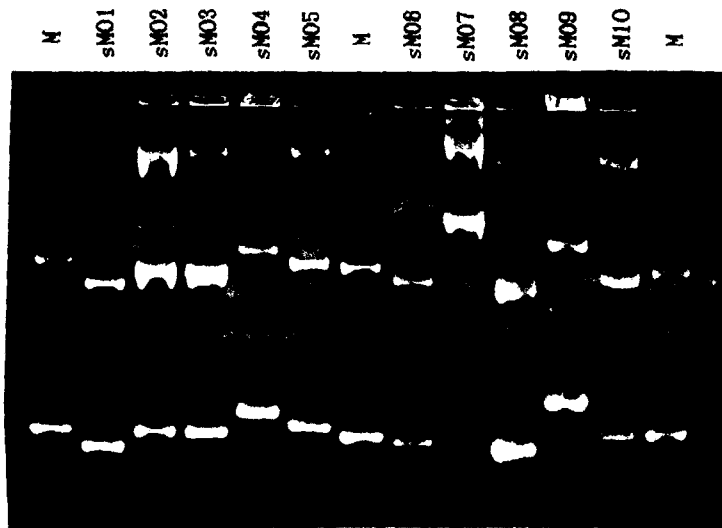


图 2.1 部分自发突变子质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

M: 质粒对照, sM: 自发突变子, sM01、sM06、sM08 的迁移速率增快, sM04、sM05、sM07、sM09 的迁移速率减慢。

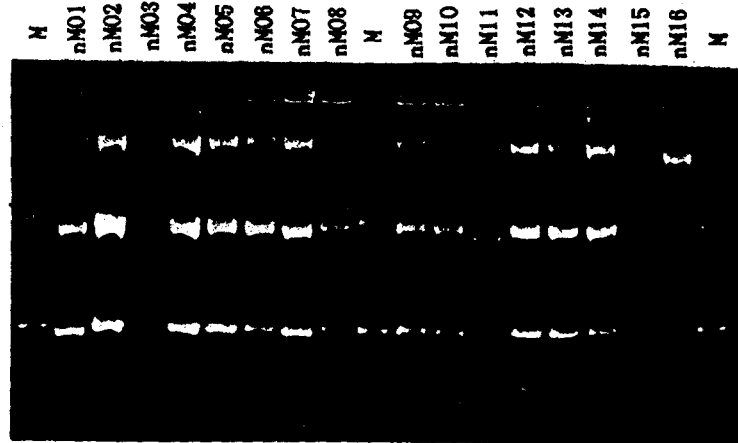


图 2.2 0.2 μ mol/L MNNG 处理组的部分突变子质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

M: 质粒对照, nM: 非定性突变子, nM01, nM11, nM16 的电泳迁移速率加快。

表 3 突变子的电泳迁移率变化和点突变频率

MNNG (μ mol/L)	转化子 (个)	电泳迁移率改变的 突变子数(个)			点突变率 ($\times 10^4$)
		加快	减慢	不变	
0	47741	6	8	10	2.1
0.2	35376	6	6	43	12.2*
2	35712	3	3	22	

* $P < 0.01$

讨论

未受到 DNA 损伤剂攻击的健全 pZ189 被引入经 MNNG 预处理的 vero 细胞中复制, 结果其点突变频率较自发点突变频率明显增加。MNNG 在 DMEM 培养基中其半衰期为 1.1h⁽¹¹⁾, 即 MNNG 处理细胞后的 24h 内已经过 22 个半衰期的降解, 而且受处理的细胞在引入质粒 DNA 之前已经多次更换溶液, 因此点突变频率的增加不可能是定性突变所致。

原核细胞中, 多种引起 DNA 复制抑制的包括烷化剂在内的遗传毒物, 可以诱导出 1 种易误性的修复(复制)机制, 导致非定性突变形成。已证实 MNNG 在大肠杆菌中诱导的部分突变是 SOS 依赖的。Fornace 的实验证实: MNNG 可以在 CHO 细胞中诱导 DNA 聚合酶 β 的 mRNA 转录⁽¹²⁾。已知哺乳类细胞中 DNA 聚合酶 β 是低水平表达的, 其功能是对损

伤 DNA 的修复。这些实验证据也支持 MNNG 可以在哺乳类细胞中诱导出类似 SOS 反应。

对突变子质粒 DNA 进行电泳迁移率的分析表明: pZ189 质粒在 vero 细胞中的自发突变主要是一些缺失、插入等改变, 这在一定程度上影响了诱发突变的研究, 尤其是在非定性突变的研究中, 突变的发生频率与自发突变频率在 1 个数量级内变化。因此用琼脂糖凝胶电泳筛选出质粒 DNA 迁移率未发生改变的突变子作为点突变现象的观察是非常有益的。

实验的结果证实 MNNG 可以诱导出 vero 细胞中的非定性突变形成, 但其详细的过程及其诱导的机制尚不清楚。用穿梭质粒系统对突变形成的研究提示: 在哺乳类细胞中存在着易误性修复或易误性复制的 DNA 聚合酶⁽¹³⁾。亦已证实哺乳类细胞中的许多基因可由 DNA 损伤诱导⁽¹⁴⁾。

MNNG 可能在 vero 细胞中诱导产生 1 种易误性的 DNA 聚合酶, 使质粒 DNA 在细胞的增殖过程中发生了非定标性突变。

对 MNNG 在 vero 细胞中诱发的非定标性突变的序列特异性分析将另文报导。

参考文献

1. Walker GC. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1984;48:60.
2. Sarasin A. SOS response in mammalian cells. *Cancer Invest* 1985;3:163.
3. Dixon K, et al. Studies on direct and indirect effects of DNA damage on mutagenesis in monkey cells using an SV40-based shuttle vector. *Mutat Res* 1989;220:73.
4. Seidman MM, et al. A shuttle vector plasmid for studying carcinogen induced point mutations in mammalian cells. *Gene* 1985;38:283.
5. Sambrook J, et al. *Molecular cloning*. 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989;1,33-1,40.

6. Sambrook J, et al. *Molecular cloning*. 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989;16.42-16.44.3
7. Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture. *J Mol Biol* 1967;20:365.
8. Smith HO, Nathans P. DpnI, the enzymes that distinguish between DNA propagated in *E. coli*(HB101) and DNA propagated in mammalian cells (monkey cells). *J Mol Biol* 1973;81:419.
9. Sambrook J, et al. *Molecular cloning*. 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989;182-184.
10. Calos MP, et al. High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3015.
11. Peterson AR. Oncogenic transformation of C3H/10T 1/2 clone 8 mouse embryo fibroblasts by alkylation agents. *Cancer Res* 1987;41:3095.
12. Fornace AJ, et al. Induction of β -polymerase mRNA by DNA-damaging agents in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 1989;9:851.
13. Seidman MM, et al. Multiple point mutations in a shuttle vector propagated in human cells; evidence for an error-prone DNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4944.
14. 张小山, 等. 哺乳类细胞中的 SOS 反应. 国外医学·分子生物学分册 待发表.

(上接第 26 页)

表 2 乙烯“稳态”浓度和小鼠体内累积剂量

实验编号	初始浓度 (ppm)	“稳态”浓度 (ppm)	体内累积比例	小鼠体内累积剂量 ($\mu\text{g}/8$ 只)	每公斤体重累积剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)
300ml	288	195	0.32	664.95	3911.47
500ml	474	339	0.29	965.25	5547.41
700ml	700	492	0.30	1487.20	8126.78

更多的工作 (如封闭以及开放系统内小鼠对乙烯的呼吸药理学以及乙烯在体内转化为环氧乙烷研究) 将于随后发表。

致谢 对本所许少甫、陈问达 2 位高级工程师在气谱技术方面所提供的帮助和建议表示衷心感谢。

参考文献

1. Abeles F.B. et al. Ethylene: a urban air pollutant. *J. Air Pollution Control Asso.* 1973;23:517.
2. Shen J.H. et al. Metabolism and endogenous production of ethylene in rat and man. In Chambers, P.L. et

al. eds. "Biological Monitoring of Exposure and Response at the Subcellular Level to Toxic Substances". New York; Springer-Verlag 1989,237.

3. Toernqvist, M. et al. Unsaturated lipids and intestinal bacteria as sources of endogenous production of ethene and ethene oxide. *Carcinogenesis* 1989;10:1.
4. Toernqvist M. et al. Ethylene oxide doses in ethylene-exposed fruit store workers. *Scand. J. Work Environ Health* 1989;5:436.
5. Bolt, H.M. et al. Olefinic hydrocarbons: a first risk estimate for ethene. *Toxicol Pathol* 1984;12:101.
6. Fliser J.G. The closed chamber technique—uptake, endogenous production, excretion, steady-state kinetics and rates of metabolism of gases and vapors. *Arch Toxicol* 1992;66:1.