

## 用<sup>32</sup>P后标记法检测固定组织(细胞)及石蜡包埋组织中DNA加成物\*

王良君 余应年 陈星若

浙江医科大学病理生理学教研室和医学分子生物学实验室 杭州 310031

**摘要** 大鼠经腹腔注射不同剂量的B(a)P48h后，取出肝脏，分为两半分别在新鲜时及经福尔马林固定后，或在新鲜时及经石蜡包埋后，分别用<sup>32</sup>P后标记法检测其DNA加成物，结果分别可分离到1个和5个加成物斑块，其相对加成物标记量(RAL)有很好的剂量—效应依赖性关系，经统计学处理后，相同剂量点上加成物的量均无显著性差异( $P>0.05$ )。不同浓度B(a)P处理后的FL细胞，再经福尔马林—磷酸盐缓冲液固定后，可分离到4个加成物斑块，其RAL有良好的剂量—效应依赖性关系。提示：固定组织(细胞)和石蜡包埋组织中RNA加成物的定性和定量均无明显的变化；<sup>32</sup>P后标记法亦可适用于固定组织(细胞)和石蜡包埋组织中DNA加成物的检测。

**关键词** <sup>32</sup>P后标记法；DNA加成物；固定组织(细胞)；石蜡包埋组织

## 32P-POSTLABELLING DETECTION OF DNA ADDUCTS IN FORMALIN FIXED AND PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SAMPLES

Wang Liangjun, Yu Yingnian, Chen Xingruo

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

**Abstract** In male SD rats, one i.p. administration of different dose of B(a)P were given. 48 hours later, then livers were removed, and each liver was divided into two halves. One was kept freshly, the other half was fixed with formalin, or in other group furthermore was embeded in paraffin. One or five adduct spots were found by <sup>32</sup>P-postlabeling assay, and the relative adduct labeling (RAL) had a good dose-response relationship, respectively. Similarly, four adduct spots were found in formalin-PBS fixed FL cells which had been treated with B(a)P, and the total RALs also had a clear-cut dose-response relationship. No significant difference can be found in both qualitative and quantitative ( $P>0.05$ ) detection of DNA adducts between fresh tissues (cells) and formalin-fixed tissues (cells) or paraffin-embeded tissues. These results indicated that DNA adducts preserved well in tissues and cells after formalin fixation and paraffin embedding, and also

indicated that  $^{32}\text{P}$ -postlabeling method was applicable to not only fresh tissues (cells), but also fixed and paraffin-embedded tissue samples.

**Key Words**  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay; DNA adduct; Fixed tissue (cells); Paraffin-embedded tissue.

$^{32}\text{P}$  后标记法是检测致瘤物—DNA 加成物最有效的方法之一，近年来，该技术发展极为迅速，在新鲜组织中已成功地检出上百种致瘤物所致的 DNA 加成物<sup>(1,2)</sup>，并且将该技术广泛地应用于与 DNA 加成物检测有关的各领域中<sup>(2,3,4)</sup>，特别是人类肿瘤分子流行病学的研究<sup>(5,6)</sup>。为此，样本的保存和来源是限制人们研究的“瓶颈”；如果能以福尔马林固定后的组织或细胞及石蜡包埋后的组织提取 DNA，然后进行研究，将会给研究者提供更多的研究机会，并可利用历史保存的样品对群体所经受环境遗传负荷进行回顾性的研究。

## 材料和方法

**动物及样本处理** 雄性 SD 大鼠(体重  $200 \pm 10\text{g}$ ，购于本校动物实验中心)腹腔注射不同剂量的 B(a)P( $\text{mg}/\text{kg}$ )：0、0.04、0.4、2.0，溶剂为二甲亚砜，注射总体积为  $300\mu\text{l}$ ；常规饲养48h后，取出肝脏下叶，一半在新鲜时提取DNA，另一半经4%福尔马林固定72h后，于室温保存1wk，再提取DNA。在另一组实验中将肝组织[B(a)P 0, 2.0 $\text{mg}/\text{kg}$ ]用石蜡包埋后，再提取DNA。

**细胞及样本处理** 人羊膜上皮细胞 FL 由本实验室液氮保存，经复苏、传代培养(Eagle's MEM, 15%小牛血清、100IU/ml 青霉素及各  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素和庆大霉素)至对数生长期，加入不同浓度的 B(a)P( $\text{mol}/\text{L}$ ) 0,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ，溶剂为二甲亚砜，各  $50\mu\text{l}$  接触24h后，收集细胞。再用4%福尔马林-PBS 溶液固定12h，室温保存1wk，提

\*省自然科学基金资助项目

取DNA。

**DNA 提取** 新鲜肝组织的DNA提取方法见文献<sup>(7)</sup>；固定组织(细胞)和石蜡包埋组织中DNA提取方法作如下修正：细胞裂解液中 SDS 及链霉蛋白酶的浓度为 1.5% 及  $2\text{mg}/\text{ml}$ ，裂解时间延长至24h时，再增加链霉蛋白酶的浓度至  $3\text{mg}/\text{ml}$ ，继续裂解48h。

**$^{32}\text{P}$  后标记法检测 DNA 加成物** 该技术涉入有关的酶、化学试剂、PEI 纤维素膜等及其基本原理见文献<sup>(7)</sup>。

## 结 果

**1. 新鲜、固定及包埋组织中 DNA 加成物的分析** 阴性对照大鼠肝组织，在新鲜、经福尔马林固定和石蜡包埋后均未分离到加成物斑块，见图1-A(见封二)。而经 B(a)P 处理后大鼠的肝组织，在新鲜时或经福尔马林固

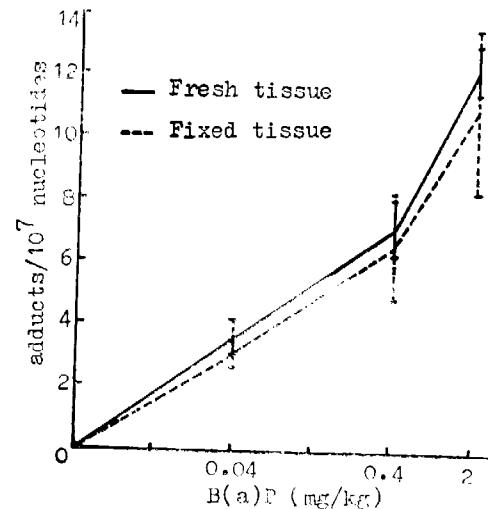


Fig. 2 The curves of dose-response of B(a)P-DNA adducts in fresh and fixed liver tissues.

定后均可分离到1个加成物斑块，分别见图1-B、C；经定量分析后，均有明显的剂量—效应依赖性关系，见图2。

石蜡包埋及相对应新鲜肝组织均可分离到5个加成物斑块，见图1-D、E；定量分析后分别为 $18.6 \pm 6.4$ ， $20.4 \pm 2.5$ （加成物个数/ $10^7$ 个核苷酸）。经统计学处理后发现，固定或石蜡包埋肝组织与对应的新鲜组织相比较没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

2. 固定细胞DNA加成物的分析 阴性对照FL细胞未分离到加成物斑块，B(a)P处理后的细胞则可分离到4个加成物斑块，分别见图3-A、B(见封二)。定量分析后发现有明显剂量效应依赖性关系，见图4。

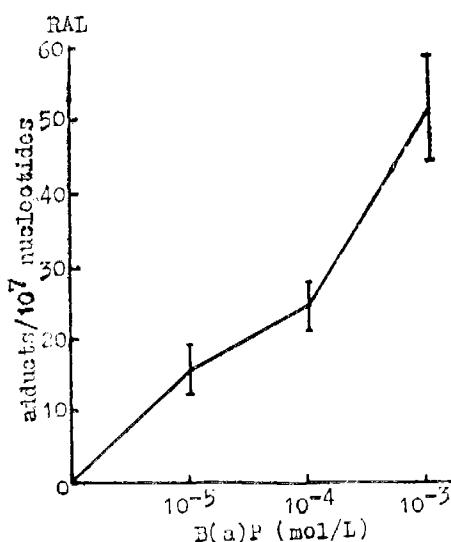


Fig. 4 The curves of dose-response of B(a) P-DNA adducts in fixed EL cells.

## 讨 论

从福尔马林固定和石蜡包埋组织中提取已成功地进行一些分子生物学实验<sup>(8,9)</sup>。本研究证明，在上述组织或细胞中均可用本技术检测到DNA加成物的存在，且加成物无论在定性还是定量上都与新鲜组织一样，没有发生明显的变化。这可归咎于活化后的致

瘤物与DNA的碱基结合系通过共价键形成。如活化后的致癌物与核酸分子中尿嘧啶或胸嘧啶的N-3、O<sup>2</sup>及O<sup>4</sup>，胞嘧啶中的N-3、O<sup>2</sup>及O<sup>4</sup>，鸟嘌呤中的O<sup>6</sup>、N-7、N-3、N-1和N<sup>2</sup>，腺嘌呤中的N-1、N-7和N<sup>9</sup>，以及主链中的磷酸二酯键和核糖的O<sup>2</sup>等位结合形成共价键。一般来说，活化后的B(a)P可作用于嘌呤的N<sup>2</sup>、C-8，腺嘌呤的N<sup>6</sup>及胞嘧啶的N<sup>4</sup>等处。在化学键中，共价键是最稳定的化学键之一，在一般状态下不会发生键的断裂和残基脱落等现象。

Harrison等<sup>(10)</sup>，利用抗AFB1-DNA加成物抗体，对经福尔马林固定后的小鼠肝组织中AFB1-DNA加成物进行检测，发现与新鲜组织无明显的差别。用抗体检测加成物时，不必经DNA的酶性消化和后标记等步骤。本研究表明，经福尔马林固定后的组织(细胞)、石蜡包埋的组织中提取的DNA及水解产物仍可作为有关酶的底物，不影响核酸酶P1、前列腺酸性磷酸酶、多聚核苷酸激酶的酶性反应。因此，<sup>32</sup>P后标记技术不仅适合于新鲜组织(细胞)，而且也适用于固定组织(细胞)或石蜡包埋后的组织中的DNA加成物的检测。

## 参 考 文 献

1. Randerath K, Randerath E, Agrawal HP, et al. Postlabelling method for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ Health Perspect*, 1985, 62(1): 57.
2. 王良君, 余应年, 陈星若. 用<sup>32</sup>P后标记法研究交链孢酮及菜油油烟凝聚物对FL细胞的DNA加成作用. 中国病理生理学杂志, (在印刷中)
3. Dunn BP. Carcinogen adducts as an indicator for the public health risk of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. *Environ Health Perspect*, 1991, 90(1): 111.
4. Lehman TA, Kurian P, Milo GE. Metabolism of and DNA adduct formation by benzo(a)pyrene in human skin epithelial cells *in vitro* pretreated with cytochrome P450

- modulators. *Cancer Biochem Biophys*, 1989, 10(4) : 345.

  5. Randerath K. Monitoring carcinogen actions on DNA by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling. *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund.* 1990, 21(2) : 317.
  6. Schoket B, Phillips DH, Hewei A, et al.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling detection of aromatic DNA adduct in peripheral blood lymphocytes from aluminium production plant workers. *Mutat Pes*, 1991, 260(1) : 89.
  7. 王良君, 余应年, 陈星若. 建立一种只标记加成后碱基的  $^{32}\text{P}$  后标记检测 DNA 加成物技术. 痕变·畸变·突变, 1993; 5(4) : 30.
  8. Goetz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1985, 130(1) : 118.
  9. Shibata D, Martin WJ, Arnheim N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections:a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res*, 1988, 48(16) : 4564.
  10. Harrison JC, Garner RC. Immunological and HPLC detection of aflatoxin adducts in human tissue after an acute poisoning incident in S. E. Asia. *Carcinogenesis* , 1991 ; 12 (4) : 741.

Digitized by srujanika@gmail.com

痴变·畸变·突变 1994年第6卷第6期

## 流式细胞术对小鼠外周血红细胞微核自动化检测的研究

曹佳<sup>1</sup> Michael Nusse<sup>2</sup> Wolfgang Beisker<sup>2</sup> Ilse-Dore Adler<sup>2</sup>

第三军医大学预防医学系分子毒理室 重庆 630038<sup>2</sup>德国环境与健康研究中心 慕尼黑 85785

**摘要** 本文报道双激光流式术对小鼠外周血嗜多染红细胞(PCE)和成熟红细胞(NCE)微核(MN)的自动化检测新方法。用噻唑橙染RNA以区分PCE和NCE,用Hoechst 33342染DNA以检测红细胞内MN。在用MMC和COL进行的MN量效和时效关系研究中,其机检和镜检结果吻合很好( $r>0.95$ ),流式仪分选验证,证实其MN真实性在95%以上,而检测速度比人工提高了40倍以上。本方法具有高速、精确、客观和完全自动化的特点,标志着流式仪对MN的自动化检测已达到实用化程度。

**关键词** 微核；流式细胞仪；自动检测

# FLOW CYTOMETRIC AUTOMATIC DETECTION OF MICRONUCLEI INDUCED BY CHEMICALS IN POLY-AND NORMOCHROMATIC ERYTHROCYTES OF MOUSE PERIPHERAL BLOOD

Cao Jia<sup>1</sup>, Michael Nosse<sup>2</sup>, Wolfgang Beisker<sup>2</sup>, Ilse-Dore Adler<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Toxicology Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing