DOI:10.16016/j.1000-5404.201602026

一种基于 ELISA 检测氮芥诱导的 MGMT-DNA 交联体的方法

阳慧琼,程 晋,丁娇艳,叶 枫,邹仲敏 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所)

[摘要] **目的** 建立一种基于酶联免疫吸附法检测 O6-烷基转移酶(O6-Methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)与 DNA 的交联体(MGMT-DNA crosslink,M-DPC)含量的简便方法。**方法** 整合当前技术提取及纯化 M-DPC、定量 M-DPC 样品中 dsDNA 含量、优化 DPC 中抗原在 ELISA 板的包被能力等关键环节。以不同浓度氮芥处理人支气管上皮细胞 HBE,在指定的时间收集细胞,使用细胞核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收法制备 M-DPC 样品。采用 SYBR Green Ⅰ染色方法对 M-DPC 样品中 dsDNA 进行定量。采用全能核酸酶对 M-DPC 样品中脱氧核糖核酸降解,以增强 M-DPC 样品中抗原在 ELISA 板的包被能力。最终,包被后的多孔板检测采用常规的 ELISA。**结果** 无需高速离心机和放射性同位素等,使用常规方法提取了细胞 M-DPC。SYBR Green Ⅰ检测基因组 dsDNA 的线性范围为 2 ng 至 1.5 μg,可以用于提取的 M-DPC 所含 dsDNA 的定量,据此统一样本用量。M-DPC 可以通过 ELISA 检出,且在一定范围内有线性关系。氮芥染毒 3 h 后 M-DPC 含量有显著增加,且对氮芥剂量有依赖。至 24 h M-DPC 含量无显著降低。**结论** 所建立的 ELISA 检测 M-DPC 的方法快速、经济、灵敏、高通量,也可应用于部分其他交联蛋白的检测。氮芥染毒所致 M-DPC 形成有时间和剂量效应。

[关键词] MGMT-DNA 交联物;ELISA;SYBR Green Ⅰ;氮芥

[中图法分类号] R446.1;R979.11;R991 [文献标志码] A

An ELISA-based method to detect MGMT-DNA crosslink induced by nitrogen mustard

Yang Huiqiong, Cheng Jin, Ding Jiaoyan, Ye Feng, Zou Zhongmin (Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish an easy method to detect the content of O6-alkyltransferase (O6 Methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT) constituted DPC, the MGMT-DNA crosslinkings (M-DPC). **Methods** Contemporary techniques was adopted and applied to some critical steps, such as M-DPC extraction and purification, M-DPC quantification, and optimizing the binding ability of M-DPC antigen to ELISA plate. Human bronchial epithelial cell line HBE was exposed to different concentrations of nitrogen mustard, and harvested at indicated time points. M-DPC samples were prepared by employing nucleus extraction, lysis and Tris-saturated phenol recovery. The dsDNA in M-DPC samples was determined by SYBR Green dye Ⅰ. To enhance the binding ability of the antigen in M-DPC samples to the bottom of ELISA plate, universal nucleic acid enzyme (Benzonase) was employed to degradate the nucleic acid in M-DPC samples. Finally, the M-DPC coated plate was subjected to the conventional processes of standard ELISA. **Results** Cellular M-DPC was successfully extracted and purified independent on high speed centrifugation and radioactive isotope labeling. The linear range of SYBR Green Ⅰ method to detect genomic dsDNA was between 2 ng to 1.5 μg, which was suitable for detecting the DNA content in M-DPC samples, and based on which equal amount of samples was adjusted and applied. The M-DPC content in sample could be detected by standard ELISA method, in a linear relationship within a certain range of M-DPC concentration. M-DPC

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81302862,81502711);全军医学科技"十二五"重大项目(AWS11C004)

[通信作者] 邹仲敏,E-mail: zouzhmin@yahoo.com

叶 枫,E-mail: kingspiderman@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1500.018.html(2016-03-22)

content was increased significantly in 3 h after nitrogen mustard treatment in a dose-dependent manner, and was maintained at a high level till 24 h. **Conclusion** Our method to detect M-DPC by ELISA is easy, rapid, sensitive, and high throughput, and may also be applied to detect DPC containing other proteins. Nitrogen mustard-induced M-DPC is in a time- and dose-dependent manner.

[**Key words**] MGMT-DNA crosslinking complex; ELISA; SYBR Green Ⅰ; nitrogen mustard

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81302862, 81502711) and the Major Project of "Twelfth Five-year Plan" of Medical Science and Technology of PLA (AWS11C004). Corresponding author, Zou Zhongmin, E-mail: zmzou@tmmu.edu.cn; Ye Feng, E-mail: kingspiderman@163.com

DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、转录因子、DNA 损伤修复蛋白等与基因组 DNA 非共价结合的相互作用,在细胞增殖和维持遗传基因的完整性等方面发挥了重要作用。然而,药/毒物暴露下形成的共价结合的交联型 DNA-蛋白复合体(DNA-protein crosslinking complex, DPC),由于阻碍了 DNA 的复制和转录,是一种严重的 DNA 损伤方式[1-3]。甲醛、辐射、氮芥、顺铂等都可以引起 DPC 生成,并引起细胞增殖旺盛的组织,如骨髓、肿瘤等的药物敏感性增加[3-5]。双功能烷化剂氮芥类药物在临床上被用于抗肿瘤,而其本身又是糜烂性毒剂的一种,能引起 DNA 烷化损伤和形成 DPC。O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase,MGMT)是一种烷基转移酶,能够移除 O6-G 上的加合物,使损伤的鸟嘌呤复原。在氮芥损伤时,MGMT 蛋白被募集到损伤的 DNA 位点,就使得 MGMT 可能成为氮芥靶点,形成 MGMT-DNA 交联体。

虽然自 20 世纪 70 年代,人们就发现 DPC 存在于多种染毒组织、细胞中,但由于相关技术复杂难以在普通实验室开展,能够形成 DPC 的药物通常伴有大量的非 DPC 损伤,欲获得较高纯度的 DPC 样品通常需要使用超速离心和同位素标记等复杂手段。

我们参考了近几年的 DPC 制备检测新方法,整合了细胞核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收法提取及纯化 M-DPC、SYBR Green Ⅰ法定量 M-DPC 中双链 DNA(dsDNA)、全能核酸酶消化增强 DPC 中抗原在 ELISA 板上的包被能力等样品处理方法和技术。该系列方法可以富集并纯化样品中的 M-DPC,保留抗原活性,进而通过 dsDNA 的定量校正上样量以检测比较各个样品中的 M-DPC 含量差异。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及染毒模型建立

人支气管上皮细胞 HBE 常规培养于含青-链霉素双抗,10% 胎牛血清(康源科技)的 MEM 培养基(HyClone)培养液,37 ℃ CO_2 培养箱培养。染毒前 1 d 传代,培养 24 h 后,细胞达到 70% ~80% 融合度。电子天平准确称取氮芥盐酸盐粉末(笛博化学科技公司),用完全培养基稀释至工作浓度(10、20、50、100 μmol/L),并迅速加入培养板中。细胞染毒 3 h 后去除染毒液,换相应的新鲜培养基继续培养。

1.2 DPC 的提取纯化

胰酶消化收集氮芥盐酸盐染毒前后细胞,PBS 洗涤 2 次后以适量的 PBS 重悬细胞。加入等量的 2 × 细胞裂解液[20 mmol/L Tris-HCl/10 mmol/L $MgCl_2$/2%(体积分数)Triton X-100/0.65 mol/L 蔗糖],冰上放置 5 min 后 2 000 × *g* 4 ℃离心 10 min。沉淀加入生理盐水-EDTA 溶液[75 mmol/L NaCl/24 mmol/L EDTA/1%(质量体积分数)SDS, pH 8.0],包含 RNase A(10 μg/mL)以及蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF; 1 μg/mL pepstatin; 0.5 μg/mL leupeptin; 1.5 μg/mL aprotinin),在 37 ℃下摇床轻微震荡 2 h。加入 2 倍体积的 Tris 饱和酚溶液,10 000 × *g* 4 ℃离心 10 min。吸取上清,加入 2 倍体积的 Tris 饱和酚∶氯仿(1∶1)溶液,10 000 × *g* 4 ℃离心 10 min 后,吸取上清。加入 10% 体积的 3 mol/L 醋酸钠,再加入 2 倍体积的无水乙醇,颠倒混匀后 -70 ℃放置 15 min。4 000 × *g* 4 ℃离心 5 min,弃上清,加入适量的 70% 的乙醇,4 000 × *g* 4 ℃离心 5 min,弃上清。晾干 10 ~20 s,加入 8 mmol/L NaOH 溶液溶解 DPC 产物。

1.3 DPC 中核酸浓度检测

采用凝胶染色用的 SYBR Green Ⅰ(瑞楚生物),使用时 1∶10 000 倍稀释。吸取 50 μL 待测 DNA(使用 TE 缓冲液调整浓度至 1 ng/μL 左右)至 96 孔板内,加入等份的 SYBR Green Ⅰ工作液,混匀后置暗处室温孵育 10 min,酶标仪上检测,Ex:470 nm,Em:520 nm。该检测结果为后续相同的上样量提供依据。标准曲线制作按照初始孔内小牛胸腺 DNA(Sigma)含量为 1 500 ng,其后按照 3 的倍数等比稀释直至 2 ng,对各孔进行荧光值检测。为比较 dsDNA 的含量与 DPC 提取细胞数量关系,收集正常的 HBE 细胞并控制细胞数量分别在 0.5×10^7、1×10^7、2×10^7,采用前述的 DPC 提取及 dsDNA 检测方法。

1.4 Slot-blot 检测 DPC 的方案

采用 GE Healthcare 公司的 48 孔狭缝印迹仪,并配上 1 台真空泵。滤纸,NC 膜预先浸泡于 TBS 中,按照先

滤纸,后 NC 膜的顺序放置于印迹台上,用加样槽轻轻盖上,并用四周的螺栓固定。对 NC 膜未能覆盖的孔给予 3% 的明胶溶液封闭,以增强印迹仪内密封性。往加样孔加入 500 μL 的 TBS 溶液,并预抽滤1 次。其后加入 500 μL M-DPC 样品溶液(不足 500 μL使用 TBS 稀释),真空抽滤后,TBS 再抽滤 2 次以充分洗涤,即可取出。后面的方法同常规的蛋白印迹。

1.5 ELISA 检测 DPC 的方案

将含 M-DPC 的样品中 $MgCl_2$浓度调整到 2 mmol/L,然后用 12.5 U 的全能核酸酶 37 ℃消化处理 30 min,以便消化 DNA 和 RNA。全能核酸酶处理的样品用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)包被,按每孔 50 ~ 100 μL 加样到 96 孔 ELISA 板,并在室温下孵育 1 ~ 2 h 或 4 ℃过夜。后续 DPC 孵育和清洗均在室温进行。PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS)洗涤酶联孔板 3 次或 4 次,并使用封闭液(含 10% BSA 的 PBS)封闭 1 h。特异性一抗孵育 2 ~ 3 h,洗涤 4 次,再用 HRP 偶联的相应二抗孵育 30 ~ 45 min,洗涤 4 次。加入 100 μL TMB 高灵敏度底物溶液,将板在暗处孵育 20 min,并通过加入 50 μL 反应停止液终止反应。在 450 nm 下读取光密度值,并通过去除 570 nm 处酶联板的本底值进行校正。样品一式两份或一式三份运行。

1.6 ELISA 检测 M-DPC 的线性范围

使用 200 μmol/L 氮芥染毒细胞 DPC 样品。DPC 上样量分别为 20、50、100、200、300、400 ng,并以 DPC 溶剂(8 mmol/L NaOH)上样作为阴性对照。将不同 DPC 含量下检测得到的光密度值进行计算,得出 ELISA 检测方法的线性范围。

1.7 ELISA 方法检测氮芥染毒细胞 M-DPC 的变化倍率

为比较不同剂量氮芥对于 M - DPC 的影响,分别设置 10、30、100 μmol/L 的染毒剂量,于染毒后 3 h 消化收集细胞样本并提取 DPC。为比较染毒后时间对于 M-DPC 含量的影响,分别在 30 μmol/L 氮芥染毒后 3、7、12、24 h 消化收集细胞样本并提取 DPC。DPC 样本经过核酸浓度测定后校正上样量以达到各组间相同的 dsDNA 含量,随后进行 ELISA 方法下的 M-DPC 检测。

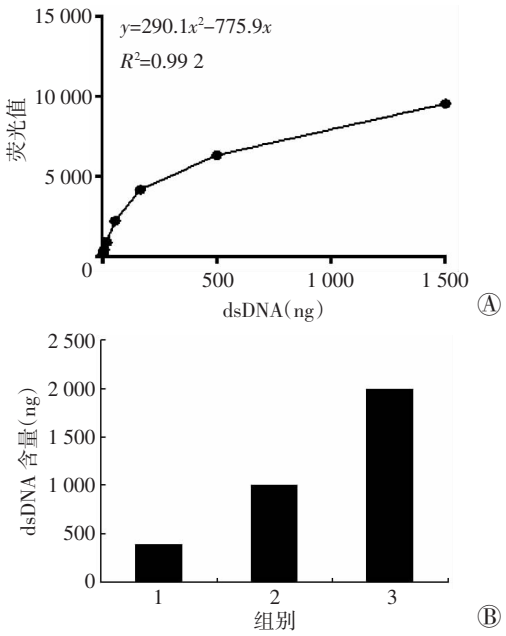
1.8 统计学处理

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样品均数比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DPC 中 dsDNA 含量测定

SYBR Green Ⅰ可以和 dsDNA 结合,发出强烈的绿色荧光,用于 dsDNA 的定量。本方法藉此对提取的 DPC 中 DNA 进行定量。首先,通过制作 DNA 浓度-荧光标准曲线,获得回归曲线;然后,提取不同细胞数量的 DPC,用 SYBR Green Ⅰ定量,同时可检验提取方法的可靠性。结果显示,SYBR Green Ⅰ可以在 2 ng 至 1.5 μg 区间内对标准 dsDNA 进行准确的定量(图 1A)。采用细胞核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收法抽提包括 DPC 的 dsDNA,其产量可以从标准曲线中计算得到,而且 DNA 总量与细胞的数量呈很好的线性关系(图 1B)。



A:采用小牛胸腺 DNA 制作的 dsDNA 含量-荧光值的标准曲线;B:采用细胞核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收法比较不同细胞数提取的 dsDNA 含量 1: 0.5×10^7; 2: 1×10^7; 3: 2×10^7

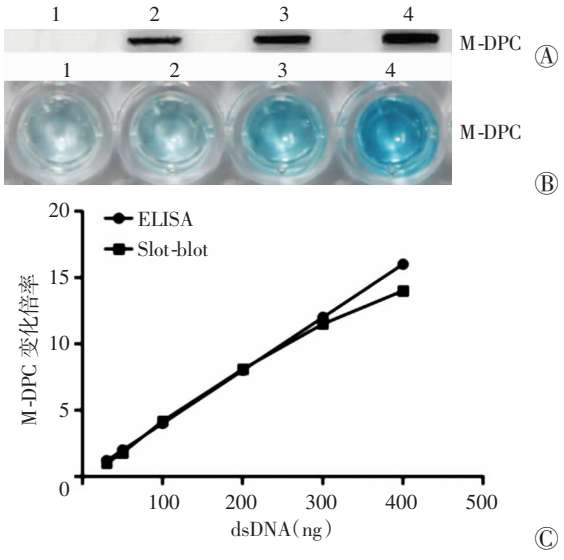
图 1 SYBR Green Ⅰ检测 dsDNA 含量

2.2 ELISA 与狭缝印迹方法的线性关系及灵敏度比较

经典的狭缝印迹先将 DPC 样本转移到印迹膜上,然后通过免疫印迹检测某种蛋白的 DPC 含量(图 2A);而 ELISA 是用提取的 DPC 样本包被酶联板,然后通过抗原抗体免疫反应和抗体偶联酶的底物显色反映某种蛋白的 DPC 含量(图 2B)。通过比较 20 ~ 100 ng 上样量,ELISA 检测结果显示,随着抗原用量的增加,显色愈加深,说明 DPC 上样量在一定范围内时,ELISA 可对 M-DPC 中抗原含量进行精确的定量。ELISA 和 Slot-blot 对于 M-DPC 的检测线性关系一致(图 2C)。

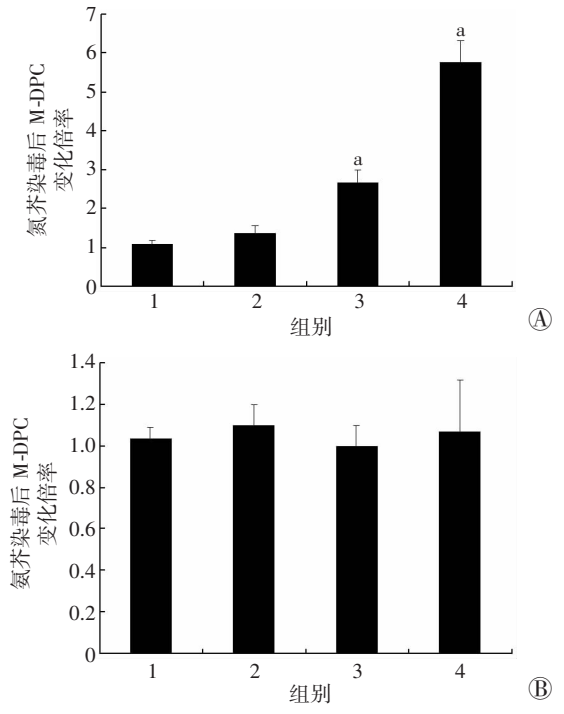
2.3 氮芥染毒细胞 M-DPC 含量变化

对照组有低水平的 M-DPC 检出,可能是 MGMT 可与 DNA 有正常的、短暂交联。氮芥染毒后的 M-DPC 有显著增加,且对氮芥剂量有依赖关系(图 3A)。30 μmol/L 氮芥染毒 3 h 后,M-DPC 水平显著升高,至 24 h 仍维持在该水平上(图 3B)。



A:Slot-blot 检测不同上样量下的 M-DPC 含量;B:ELISA 检测不同上样量下 M-DPC 含量　1:空白孔;2: 50 ng dsDNA; 3: 100 ng dsDNA; 4: 300 ng dsDNA;C:M-DPC 检测的线性关系及灵敏度比较

图 2　ELISA 与狭缝印迹方法检测 100 μmol/L 氮芥染毒的 M-DPC 样本



A:不同剂量的氮芥染毒 HBE 3 h 后 M-DPC 含量变化 1:对照组;2: 10 μmol/L 氮芥染毒组;3: 30 μmol/L 氮芥染毒组; 4: 100 μmol/L 氮芥染毒组;B: 30 μmol/L氮芥染毒后不同时间点 M-DPC 含量变化　1:氮芥染毒后 3 h; 2: 氮芥染毒后 7 h; 3: 氮芥染毒后 12 h; 4: 氮芥染毒后 24 h; a:$P<0.01$,与对照组比较

图 3　ELISA 检测氮芥染毒 HBE 后 M-DPC 含量的变化

3　讨论

MGMT 作为一种具有特殊功能的 DNA 修复酶,主要修复 DNA 的烷化损伤,是临床抗肿瘤烷化剂耐药的主要机制。但是,在氮芥类药物的作用下,募集到 DNA 烷化位点的 MGMT 可以成为烷化剂的底物,使 MGMT 与 DNA 形成交联体,形成的 M-DPC 无疑具有重要的毒理学意义[6]。文献[7]报道,M-DPC 的形成可能与 MGMT 的活性氨基酸残基位点,如 cys145、Tyr114、Arg128、Pro140 和 Tyr158 等有关。M-DPC 被证实具有致 DNA 复制损伤和突变的多重作用。在一些 MGMT 丰富的组织或细胞中,双功能烷化剂引起的 M-DPC 的增加被认为是动物/细胞毒性反应的重要原因[8-9]。因此,检测细胞或组织样品中 M-DPC 水平有重要意义。

氯化铯密度梯度超速离心法是标准的 DPC 制备方法,该法制备的 DPC 纯度高,交联蛋白活性保存好,缺点是步骤烦琐,需应用到超速离心机(>100 000 ×g)等昂贵设备,一般实验室无法开展。核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收法是 Michaelson-Richie 等[5]于 2011 年报道的一种 M-DPC 的制备方法,并可以通过 Slot-blot 检出。我们采用了该方法,并进行了部分改动,结果显示 M-DPC 的制备稳定,重复性好。一些更为简单的方法近年来也有报道,如 Kiianitsa 等[10]报道使用利用商品化的 DNA 提取试剂(如 DNAzol 等)处理得到 DPC 样品,可以对喜树碱诱导的 TOP1 交联蛋白进行检测,作者称之为 DNA 加合物快速回收法(RADAR,rapid approach to DNA adduct recovery),由于有异硫氰酸胍等强变性剂存在,可能会对部分交联蛋白的抗原活性有影响,因此我们推测并不能适用于所有的交联蛋白。我们也采用了一种 DNAzol 的同类试剂(DNAiso,TaKaRa)可以提取并检测出 M-DPC。值得注意的是,该法所提取的 M-DPC 的含量与核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收法虽然相似,但 dsDNA 回收得率数倍高于后者,可能是 DNAiso 添加的试剂裂解性更强,DNA 更加完整等所致。

狭缝印迹是一种常用的 DPC 检测方法,主要采用将 DPC 样品通过抽真空的方式使其吸附在 NC 膜上,之后通过常规免疫印迹的方法对 DPC 检测,该过程需要应用到一些特殊的设备。2014 年 Kiianitsa 等[11]开发了基于 ELISA 检测 DPC,在采用了多种类型的 ELISA 来检验 DNA 拓扑异构酶 TOP1/TOP2a-DNA 交联体,发现都不能很好地检出,原因在于 DPC 中的 DNA 成分影响了交联蛋白与 ELISA 板上包被抗体的结合能力。采用核酸酶消化 DPC 中 DNA 后,再进行

DPC 的检测,信号大大提高。因此,在 ELISA 检测 DPC 的过程中,控制 DPC 中核酸含量是一个关键性的技术指标。ELISA 是一种基于免疫反应的方法,具有快速、敏感、高通量等优点,在临床检验或者科研实验中有广泛应用。我们采用 ELISA 检出 M-DPC 在染毒 3 h 后显著增加,且与染毒剂量有相关性。M-DPC 一旦形成,则稳定存在。

DPC 检测技术向着简便化、快速化发展,基于 ELISA 检测 DPC 是重要的方向。我们结合新近报道的 DPC 的制备及其检测方法,建立了基于细胞核抽提/裂解/Tris 饱和酚回收的 DPC 制备检测方法,可以快速、经济、准确地检测 M-DPC,为科研或临床相关工作开展提供便利。同时,该方法可能也广泛适用于 MGMT 以外的其他交联蛋白。

参考文献:

[1] Nakano T, Morishita S, Katafuchi A, *et al*. Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks[J]. Mol Cell, 2007, 28 (1): 147 – 158. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.07.029

[2] Nakano T, Katafuchi A, Matsubara M, *et al*. Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(40): 27065 – 27076. DOI: 10.1074/jbc.M109.019174

[3] Ide H, Shoulkamy M I, Nakano T, *et al*. Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks[J]. Mutat Res, 2011, 711(1/2): 113 – 122. DOI: 10.1016/ j.mrfmmm.2010.12.007

[4] Wong V C, Cash H L, Morse J L, *et al*. S-phase sensing of DNA-protein crosslinks triggers TopBP1-independent ATR activation and p53-mediated cell death by formaldehyde[J]. Cell Cycle, 2012, 11(13): 2526 – 2537. DOI: 10.4161/cc.20905

[5] Michaelson-Richie E D, Ming X, Codreanu S G, *et al*. Mechlorethamine-induced DNA-protein cross-linking in human fibrosarcoma (HT1080) cells [J]. J Proteome Res, 2011, 10(6): 2785 – 2796. DOI: 10.1021/pr200042u

[6] Pegg A E. Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools[J]. Chem Res Toxicol, 2011, 24(5): 618 – 639. DOI: 10.1021/tx200031q

[7] Loeber R, Rajesh M, Fang Q, *et al*. Cross-linking of the human DNA repair protein O6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of 1, 2, 3, 4-diepoxybutane [J]. Chem Res Toxicol, 2006, 19(5): 645 – 654. DOI: 10.1021/tx0600088

[8] Kalapila A G, Pegg A E. Alkyltransferase-mediated toxicity of bis-electrophiles in mammalian cells[J]. Mutat Res, 2010, 684(1/2): 35 – 42. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.11.006

[9] Kisby G E, Olivas A, Park T, *et al*. DNA repair modulates the vulnerability of the developing brain to alkylating agents [J]. DNA Repair (Amst), 2009, 8(3): 400 – 412. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.12.002

[10] Kiianitsa K, Maizels N. A rapid and sensitive assay for DNA-protein covalent complexes in living cells[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(9): e104. DOI: 10.1093/nar/gkt171

[11] Kiianitsa K, Maizels N. Ultrasensitive isolation, identification and quantification of DNA-protein adducts by ELISA-based RADAR assay [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(13): e108. DOI: 10.1093/nar/gku490gku490

(**收稿**:2016-02-10;**修回**:2016-03-18)

(编辑 郭建秀)