DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.037

经验交流

文章编号:1000-5404(2003)19-1776-02

λDNA体外重包装突变检测系统的构建及对环境和军用毒物的检测

Construction of a new mutation detection system of repackaged λDNA and its application in screening of toxicants in environment and military condition

刘晋[illegible] 曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038)

利用λDNA体外重包装技术,建立了含*LacZ*靶基因的λDNA致突变检测系统。该系统直接用受试化合物处理λDNA,并在体外包装成噬菌体颗粒、在选择培养基上培养,通过计数清亮突变体噬菌斑和蓝色正常噬菌斑的数目计算突变率和噬菌斑的存活率,从而初步观察化合物的遗传毒性作用。通过扩增阳性克隆分析*LacZ*靶基因的序列,或通过对化合物处理后的λDNA进行酶切、电泳分析,可深入研究化合物分子致突变谱。

1 技术原理

λDNA重包装技术是基因工程中的一个重要技术,它是在离体的条件下,将λDNA或者含有插入目的基因的λDNA与特殊的噬菌体壳蛋白混合,装配成为完整的具有感染活性的噬菌体颗粒的过程。一般情况下,在包装过程中,要求λDNA的长度是野生型λDNA的75%~105%之间;另外,λDNA噬菌体约有60多个基因,其中一半参与了噬菌体的生命周期,完成包装过程必须要求相关基因结构完整[1]。如果我们直接用诱变剂处理λDNA,导致λDNA链的断裂,或者诱发λDNA上相关基因的突变,那么就可能导致包装效率的下降,通过观察化合物处理后的λDNA重包装噬菌体的形成率,初步评价化合物是否具有遗传毒性[2]。如果受试化合物直接导致DNA断裂,或者诱发DNA交联,受试化合物处理后的DNA酶切电泳图谱会发生改变,从而就可以对化合物的致突变机制进行初步分析[3];通过提取和分析靶基因序列,可以获得化合物分子突变谱[4],见图1。

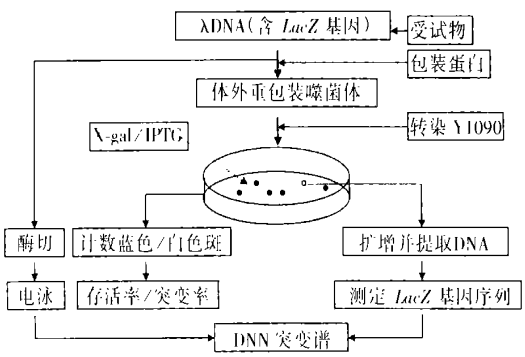


图1 λDNA体外重包装突变检测系统的技术原理

2 实验方法及关键步骤

2.1 λ噬菌体特殊菌株基因型的鉴定

用于制备λ噬菌体头、尾部包装蛋白的特殊菌株为*E. Coli* BHB2688和*E. Coli* BHB 2690。菌株的鉴定方法参照文献[1,2]进行。

2.2 λDNA包装蛋白制备以及包装蛋白制备最佳条件的探讨

制备高效率的λDNA包装蛋白,是实验顺利进行的关键条件。我们对此进行了优化,结果发现制备优质的包装蛋白需要注意以下条件:①过夜菌不能超过30 ℃;②cIts857基因的失活诱导过程,温度梯度越大,效果越好;③用菌株*E. Coli* BAB2690制备前头部蛋白时,需要用超声波处理破壁,超声条件应掌握在200~220 W超声18 s,间隔30 s,共18次,效果较好;④包装蛋白制备物可由原来的-70 ℃贮存,改为在-10~+4 ℃条件下分装保存;包装蛋白可反复冻融,不影响包装有效性,不会显著降低包装效价。

2.3 化合物处理λDNA及λDNA体外重包装

参照文献[5]方法进行。

2.4 包装效率的确定

将不同稀倍数的噬菌体转染宿主菌LE392,铺皿,置42 ℃培养24 h;计数噬菌斑的数目,计算对照组包装效率(一般为1×10^5~1×10^7)和每微克λDNA噬菌斑形成率(一般为5×10^5~1×10^8)[6]。

2.5 突变率和存活率计算

参照文献[5]方法进行。

2.6 化合物突变机制的分析

经分析能明显诱导存活率下降和突变率上升的化学物,一般确定为阳性化学物,对其致突变机制的进一步分析,我们采用了两种方法:①重新以致毒剂量处理λDNA,然后用DNA限制性内切酶对λDNA进行酶切,经琼脂糖凝胶电泳分析,初步了解阳性受试物导致噬菌斑存活率下降的遗传毒性及其可能的分子机制[7~10]。②挑取清亮型突变噬菌斑在选择培养基上培养重新培养,选取仍为清亮型的噬菌体进行铺皿扩增,提取突变体DNA。采用PCR技术扩增λgt11 DNA中的*LacZ*基因,通过DNA测序确定化合物致突变的分子机制[5,11]。

3 λDNA体外重包装突变检测系统的应用

3.1 测试的化合物

利用该系统对33种化学物、紫外线和微波遗传毒性进行

基金项目:国家自然科学基金资助项目(38806 80;39670643)和全军"九五"青年基金资助项目(J96-4-2)
作者简介:刘晋[illegible](1970-),男,四川省苍溪县人,博士,讲师,主要从事分子毒理学方面的研究。电话:(023)68752296
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn.
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-06-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

了初步评价。这些受试物(因素)按其不同性质或作用方式可分为 9 类: ①DNA 损伤诱变剂 9 种; ②DNA 合成抑制剂 3 种; ③DNA 代谢药物 3 种; ④纺缍体蛋白毒剂 2 种; ⑤抗生素类药物 4 种; ⑥蛋白质变性剂 4 种; ⑦强氧化还原剂 2 种; ⑧金属化合物与类金属化合物 3 种; ⑨其它 3 种。经分析, 其中 26 种化合物明显导致噬菌体包装效率和存活率的下降, 即对λDNA 具遗传毒性; 其中 18 中为公认的已知强诱变剂或者在有限检测方法下的阳性诱变剂, 其余 8 种为首次检测的受试物。新方法检测里呈阴性反应的受试化学物中, 仅已知为阳性点突变剂的 5-溴尿嘧啶被检为假阴性[7]。

3.2　化合物突变机制的分析

对部分初步确定为阳性化学物的受试物, 重新以致毒剂量处理λDNA, 然后用 DNA 限制性内切酶消化, 经琼脂糖凝胶电泳分析。结果发现 $CuSO_4$ 为移码突变剂[7]; 丝裂霉素 C、氨甲喋呤和 $NaHSO_3$ 3 种化合物为 DNA 的随机断裂剂[4,8]; 甲基磺酸乙酯(EMS)除可造成 DNA 点突变和移码突变外, 在我们的实验中发现 EMS 可能还是一种 DNA 分子交联剂[4]。二甲基亚砜(DMSO)、乙醇和丙酮 3 种有机溶剂, 在 75% 以上浓度时对λDNA 分子具有遗传毒性, *Eco*RI 酶切泳带迁移率发生了异常改变[8,9]。此外, 在λDNA 体外重包装致突变系统中检出为强阳性反应的某些重金属试剂($HgCl_2$)、抗生素(链霉素、卡那霉素、庆大霉素)、蛋白质毒剂(36% 甲醛溶液)、强氧化还原剂(30% 过氧化氢)、脂溶性有机磷农药(乐果)的"酶切、凝胶电泳"的谱带出现拖带、紊乱或出现异常电泳条带, 对相关机制也正在研究中[7]。

对阳性受试物 ENU, 9-AA 处理诱发的突变噬菌体中 *LacZ* 基因进行了序列分析, 确定了两种化合物分子突变类型。ENU 诱发的碱基突变主要是碱基置换, 而且作用热点在 GC 序列, 表明 ENU 是一种点突变剂和移码突变剂[11]。9-AA 主要诱发移码突变, 移码突变主要集中在 Gs, Cs, As, Ts 重复区内; 9-AA 同时还能诱发碱基置换, 碱基置换主要表现为颠换, 而碱基转换主要发生于 Gs 碱基[5]。表明该检测系统在化合物分子突变类型和分子致突变机制的研究中具有较广的应用前景。

4　新方法的主要特点

将该检测系统分析化学物的实验结果、方法的特异性、敏感性和准确性等方面与其它检测方法进行了系统的横向比较研究, 这些方法有 Ames 试验、微核试验、SOS、染色体畸变试验、原噬菌体诱导法等, 结果表明新方法具有以下一些特点。

第一, 实验周期短。本检测系统可以分为 3 个阶段: 包装蛋白的制备、λDNA 体外重包装和噬菌体培养。其中, 包装蛋白的制备所需时间较长, 但由于一次制备可以获得大量的包装蛋白, 满足长期使用。因此, 实际化合物毒性从第二阶段开始, 全流程仅需 16～20 h; 用"酶切—凝胶电泳法"初步分析诱变剂遗传毒原因的实验周期更短, 从药物处理到电泳结果, 最快只需 4 h[2,12]。

第二, 阳性检出率高。在用新方法测试的 33 种化学物中, 仅已知为阳性点突变剂的 5-溴尿嘧啶被检为假阴性, 因此新方法具有阳性检出率高的优点。

第三, 灵敏度高。采用受试化合物直接处理裸露的λDNA, 是本法的一个显著特点。由于 DNA 与受试物直接接触, 所需化合物剂量较低, 且受试物对 DNA 损伤更为直接, 大大提高了检测的敏感性[11]。与 Ames 实验中所用剂量相比, 新方法所能检测出的阳性诱变物阳性结果所用的剂量缩小了 2.5～30 倍。

最后, 实验操作简单、经济、实用。新方法仍是一个微生物实验, 采用的是基因工作中的常规技术, 技术难度小, 且无需特殊的试剂。经我们分析, 如果仅对化合物进行初步评价, 所需费用比 Ames 实验低。

5　存在的问题

靶基因一般由于片段较小、序列已知等特点, 被广泛用于致突变检测系统的构建。我们构建的含 *LacZ* 基因的λDNA 体外重包装系统, 以噬菌体存活率、突变率和分子突变谱为检测终点, 使该检测系统具有较高的灵敏度和特异性, 可用广泛于军用和环境毒物遗传毒性分析, 以及军事斗争、生产、生活等领域各种新化合物遗传毒性的快速初步评价。

但是, 本检测系统仍属于原核生物体外测试系统, 不能取代体内试验, 尤其是检测一些需经代谢活化的间接致突变物。在今后的实验中, 拟加入 S9 体外模拟代谢系统, 扩大本检测系统检测化合物的范围。在对化合物诱导靶基因突变谱的分析方面, 直接测序虽然准确可靠, 但是通常仅仅分析靶基因内的部分区段, 全部序列测定是不可行的, 而且无疑增加了实验的成本。因此, 拟利用 SSCP、PCR 等技术, 筛选出含有突变的区域再进行序列分析。同时, 在完善该检测系统的基础上, 进一步简化实验方法, 为其广泛推广应用奠定基础。

关键词: λDNA 体外重包装; *LacZ* 靶基因; 检测
中图法分类号: Q78　　文献标识码: B

参考文献:

[1] J. 萨姆布鲁克, E. F. 佛里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1992. 146—153.
[2] 曹　佳, 曹　阳, 许丽萍, 等. λDNA 体外重包装法进行化学诱变的初步研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1991, 3(4): 40—45.
[3] Liu Y, Cao J, Wu T, *et al*. New mutation detection system of repackaged λgt11 DNA containing *LacZ* gene[J]. J Med Coll PLA, 2002, 17(3): 162—166.
[4] 曹　阳, 曹　佳, 许丽萍, 等. 22 种化学物和紫外线对λDNA 的遗传毒性分析[J]. 中国环境科学, 1994, 14(2): 139—42.
[5] 刘　勇, 曹　佳, 孙华明. 9-氨基吖啶诱导 *LacZ* 靶基因突变分子机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 23(1): 52—54.
[6] Sterghner R J, Povirk L F. Effect of *in vitro* cleavage of apurinic/apyrimidinic sites on bleomycin-induced mutagenesis of repackaged lambda phage [J]. Mutat Res, 1990, 240: 93—100.
[7] 曹　佳, 曹　阳, 许丽萍. λDNA 体外重包装技术检测环境致突变物新方法及机理的研究[J]. 重庆环境科学, 1996, 18(2): 40—42.
[8] 曹　佳, 杨录军, 曹　阳, 等. 几种代谢和抗代谢药物对λDNA 的遗传毒性分析[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(1): 65—67.
[9] 曹　阳, 胡维民, 曹　佳, 等. 二甲基亚砜在λDNA 重包装中的遗传毒性研究[J]. 卫生毒理学杂志, 1996, 10(1): 40—42.
[10] Cao Y, Cao J, Zhang L, *et al*. Analysis of genetic toxicity of 22 chemicals and unltraviolet(UV) to λDNA[J]. Mutat Res, 1997, 379(1 Suppl), S80.
[11] 吴　涛, 曹　佳, 钱　频, 等. ENU 诱导 *LacZ* 靶基因的λgt11 DNA 突变分子机理的初步研究[J]. 遗传, 1999, 21(1): 19—22.
[12] 曹　佳, 曹　阳, 许丽苹, 等. 一种新的致突变物检测方法-λDNA 体外重包装法的构建Ⅰ12 种化学受试物致突变性的初步研究[J]. 癌变·畸变·突变, 1991, 8(2): 28—29.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net