DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.025
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
52 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0052-03

9-氨基吖啶诱导LacZ靶基因突变分子机制的研究

刘 勇,曹 佳,孙华明 (第三军医大学预防医学系卫生毒理学教研室、分子毒理学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 使用我室新构建的含LacZ靶基因的λ gt11DNA体外重包装致突变检测系统,研究了移码突变剂9-氨基吖啶(9-AA)诱发突变及分子突变谱,并进一步对该系统的可行性进行了评价。方法 用9-AA直接处理λ gt11DNA,经体外重包装为完整噬菌体、铺皿,通过X-gal和IPTG检测突变率,使用DNA测序了解阳性克隆DNA分子改变情况。结果 9-AA能明显影响噬菌体的存活率和诱发DNA突变,突变率呈明显剂量-反应关系;9-AA主要诱发移码突变,移码突变主要集中在Gs、Cs、As、Ts重复区内且突变频率随碱基重复长度增加而增加;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。结论 该致突变检测系统不仅可以快速,灵敏地筛选出外来化合物的遗传毒性,而且可以深入分析外来化合物致突变分子机制。

关键词:9-氨基吖啶;LacZ基因;突变检测
中图法分类号:R394.3 文献标识码:A

Molecular mechanism of LacZ gene mutagenesis induced by 9-aminoacridine

LIU Yong, CAO Jia, SUN Hua-ming (Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract Objective To analyze the mechanism of molecular mutagenesis induced by the 9-aminoacridine (9-AA) with the molecular mutation detective system of λ gt11DNA with LacZ gene and to evaluate this detective system. Methods The 9-AA-damaged λ gt11DNA was added to Lambda packaging extracts and then the repacked Lambda phage were cultured in *E. coli* Y1090 on a selective plate pre-supplemented with X-Gal and IPTG. The positive cloned DNA molecule was determined with DNA sequencer. Results 9-AA had an obvious effect on the survival rate of the Lambda phage and induce DNA mutation in a dose-effect manner. The 9-AA induced not only frameshift mutations, but also base substitutions. The frameshift mutation mainly occurred in the repeats of As, Cs, Gs, and Ts, and the frequency elevated linearly with the increasing amount of As, Cs, Gs, and Ts in the repeat. The 9-AA-induced base substitutions were mainly base transversion, and the base transition was only in Gs repeat. Conclusion With this mutagenesis detective system, the genetic toxicity of exogenous compound can be easily investigated and the mechanism of molecular mutagenesis can also be obtained.

Key words 9-aminoacridine; LacZ gene; mutation

建立快速、灵敏、可靠性高的致突变检测系统,一直是遗传毒理学和分子毒理学研究的重要内容。近年来,许多靶基因被引入到致突变系统中,以便直接从DNA分子水平获取DNA突变的证据,更准确地评价各种外来化合物的遗传毒性,阐明癌变、突变、畸变的分子机制。我室前期成功地构建了λ DNA体外的重包装致突变检测系统[1],近年来更进一步在该系统内引进了LacZ靶基因。该系统在试管内用受试物直接作用于含lacZ靶基因的λ gt11DNA,在体外重包装成噬菌体,通过含X-gal和IPTG的培养基的产色反应来检测突变率,以评价受试物的遗传毒性;通过筛选突变体(清亮噬菌斑)、扩增和提取其DNA进行DNA测序,来进行受试物致突变分子机制的研究[2]。本实验以典型的移码突变剂9-氨基吖啶(9-aminoacridine, 9-AA)为受试物[3],进一步评价该致突变检测系统的可行性、可靠性,以及深入分析9-AA致突变的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *E. coli* BHB 2688, *E. coli* BHB 2690(由中山大学刘良式教授惠赠)。大肠杆菌Y1090, rk⁻lac⁻lon⁻, Supf F, hsdR,由本室保存,λ gt11DNA(含lacZ gene)购自Promega公司。

1.1.2 9-AA购自Fluka公司。

1.1.3 LacZ基因扩增和测序引物 正向引物(Primer 1):位于LacZ基因1965~1989 bp处,序列为5'> GGT GGC GCT GGA TGG TAA GCC GCT< 3'。反向引物(Primer 2):位于LacZ基因3066~3042 bp处,序列为:5> TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG< 3'。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株基因型的鉴定、包装蛋白的制备、包装效率的确定,参考曹佳[3]的方法。

1.2.2 9-AA处理λ gt11 DNA及λ DNA体包重包装 将5 μl不同剂量受试物(0.95、1.2、1.5、1.8 μg)加入到5 μl(0.5 μg)λ gt11 DNA(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 10 mmo/L $MgCl_2$)中,混匀,37 ℃温育30 min;置冰上10 min终止反应。取出低温下保存的包装蛋白,置冰上融化;将10 μl先融化的尾部蛋白转移至15 μl仍处于冰冻的头部蛋白中,待合并的包装蛋白全部融化时,加入上述10 μl经受试物处理的λ gt11 DNA,轻轻混匀,置室

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670643)和全军"九五"青年基金资助项目
作者简介:刘 勇(1970-),男,四川省苍溪县人,硕士,副教授,主要从事分子毒理学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752295
收稿日期:2000-03-11;修回日期:2000-05-27

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

温 2 h。加入 SM 液 450 μl、氯仿 25 μl, 混匀。(此时可置－4 ℃保存)。

1.2.3　重包装噬菌体的培养, 阳性突变体的鉴定、扩增以及 λDNA 提取, 参照文献[2]进行。

1.2.4　突变体 λ gt11 DNA 中 LacZ 基因 PCR 扩增和 DNA 测序

每一突变体 λ gt11 DNA 在 50 μl 反应体系中进行 PCR 反应: 100 ng DNA, 1 × PCR buffer [10 mmol/L KCl, 8 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 2 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 0.1% NP40], 2.5 U Taq 酶(购自上海生工公司), 200 mmol/L dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30 pmol primer 1, 30 pmol primer 2。PCR 反应条件: 95 ℃ 2 min; 30 循环(95 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s); 72 ℃ 10 min, 保持于 4 ℃。反应完毕, 采用乙醇沉淀法回收 PCR 产物; 电泳确定扩增片段的正确性及纯度; PCR 产物采用荧光标记 DNA 自动测序法测序(赛百盛生物工程公司测序中心分析), 每一样品读取 700～800 bp 碱基, 取前 500 bp 进行突变分析。

2　结果

2.1　9-AA 对噬菌体存活率和突变率的影响

在预实验中, 先用每 5 μl 0.25、0.5、1、2 μg 剂量作用于 λ gt11 DNA, 发现 0.25、0.5 μg 剂量组与对照噬菌斑存活率无明显差异; 而 1 μg 组与对照组有差异; 2 μg 组仅出现 1 个菌斑。因此, 最后从 2 μg 组下推 0.2 μg 作为最高剂量, 按每 5 μl 0.3 μg 等差数值设置正式实验的剂量。结果表明, 9-AA 能明显影响噬菌体重包装, 噬菌体存活率明显下降, 与对照相比差异极显著($P<0.001$)。9-AA 导致存活率的变化曲线并不呈线性关系, 而是在 1.5～1.8 μg 剂量间噬菌斑数有明显下降, 同既往的研究相同, 具有"陡坎效应"[3], 见表 1。

通过 x-Gal 和 IPTG 筛选, 很容易通过噬菌斑颜色来计数突变噬菌斑(清亮型)和正常噬菌斑(蓝色)。由表 1 可知, 9-AA 能明显诱发 LacZ 靶基因的突变, 突变率呈明显的剂量-反应关系, 与对照相比, 差异非常显著($P<0.001$)。

表 1　氨基吖啶对噬菌体存活率及实变率的影响

Tab 1　Effect of 9-AA on Survival and frequency of Lambda phage

Dose (μg/5 μl)	Total No. phage[a]	No. mutation plaque	Survival (%)[b]	Mutation rate
0	22 100	0	100	$<5\times10^{-5}$
0.9	1 940	1	8.78 **	5×10^{-4} **
1.2	1 357	3	6.14 **	2.2×10^{-3} **
1.5	1 102	4	4.98 **	3.6×10^{-3} **
1.8	69	1	0.31 **	1.4×10^{-2} **

a: Total phage numbers of 4 plates in every dosage; b: Proporation of phage numbers between treated groups and control group; **: $P<0.001$ *vs* normal control group

2.2　9-AA 诱导的分子突变谱

9-AA 是已被大家公认的一种经典移码突变剂, 但在我们分析的 48 个突变位点中观察到以下新的现象: ①9-AA 不仅可以诱导碱基的插入或丢失, 从而导致移码突变, 而且可以引发碱基置换; 其中移码突变为主要作用(71.7%), 碱基置换为次要作用(28.3%), 见表 2; ②9-AA 诱导 4 种碱基发生移码突变概率较为均衡(G、A、T、C 分别为 24.2%, 27.3%, 24.2%, 24.2%), 这与前人报道的 9-AA 诱导移码突变主要集中在 Gs 重复区域不同; 同时, 9-AA 诱导 Cs 的突变主要是丢失, 见表 2; ③9-AA 诱发碱基置换主要发生在 G-C 碱基对上(占 76.9%), 且碱基置换主要表现为颠换; 碱基转换仅发生在 Gs 上, 见表 2。

表 2　9-氨基吖啶诱导的 **LacZ** 基因突变

Tab 2　Mutations in LacZ gene induced by 9-AA

	Framshift mutation			Base substitution		
	Deletion	Insertion	Total mutation	Transition	Transversion	Total mutation
G	5	3	8(24.2%)	2	4	6(46.2%)
A	5	4	9(27.3%)	0	2	2(15.4%)
T	3	5	8(24.2%)	0	1	1(7.7%)
C	7	1	8(24.2%)	0	4	4(30.7%)
Total			33(71.79%)			13(28.3%)

2.3　9-AA 诱发碱基突变与 4 种碱基组成及其重复长度的关系

通过分析整个测序片段中 4 种碱基组成及其重复单位的数目与突变的关系, 发现 9-AA 诱发碱基插入或丢失主要集中在相同碱基重复序列区(如 TTTT), 且发生移码突变的频率随着单个碱基重复长度的增加而明显上升, 在 4 个碱基重复区内, 平均突变率高达 40%; 而单个碱基移码突变的发生率仅 1%; 对每一类碱基来说, 移码突变的发生率亦是随着邻近相同碱基重复数目的增加而明显增加, 如 As 碱基重复由 A、AA、AAA、AAAA 的增加, 突变的发生率分别为 3.0%、3.0%、40%和 60%; 但 TTTTT 和 AAAAAA 在测序片段中未发生突变, 原因不详, 见表 3。

表 3　移码突变与 4 种碱基组成及其重复长度的关系

Tab 3　Relation of composition and repeat length to the occurrence of single-base frameshift mutations

Repeat length	Deletion (insertion) /target size				
	A(%)	G(%)	C(%)	T(%)	total(%)
1	4/135(3.0)	0/169(0)	0/164(0)	2/123(1.6)	6/591(1.0)
2	1/33(3.0)	8/54(14.8)	3/49(6.12)	3/28(10.7)	15/164(9.2)
3	2/5(40)	2/9(22.2)	2/9(22.2)	2/5(40)	8/28(28.6)
4	3/5(60)	0/2(0)	1/2(50)	0/1(0)	4/10(40)
5	—	—	—	0/1(0)	0/1(0)
6	0/1(0)	—	—	—	0/1(0)
Total	10/242(4.13)	10/312(3.21)	6/298(2.01)	7/203(3.45)	

—: Indicate no this kind type of base in sequencing fragment

从表 3 可知, 在整个测序片段内, 对于 4 种不同碱基移码突变发生率是不一致的, A 及其重复序列发生率最高达 4.13%, T、G、C 分别为 3.45%, 3.21%, 2.01%, A 和 C 相差了 1 倍; 单个 G、C 在整个测序片段位点数为 169、164, 远远高于 A(135), TC(123), 但没有一个发生移码突变, 以上说明 9-AA 对碱基可能有一定的选择诱发突变作用。

9-AA 除诱发碱基移码突变外, 还明显诱发碱基置换。碱基置换与邻近序列未有明显的规律性, 见表 4。但是, 从碱基置换的结果看, 除了 2392 位点 AAGC→AATC 外, 其余的碱基置换后均是形成 2 个或 2 个以上的重复, 这是值得关注的。

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

表 4 氨基吖啶诱导 LacZ 基因的碱基置换

Tab 4 Single-base substitution in LacZ gene induced by 9-AA

Mutation type	Position in gene	Sequence surrounding the mutated base	Mutation type
G→T	2392	AAGC→AATC	transversion
	2416	AGTG→ATTG	
A→T	2371	ATAA→ATTA	transversion
	2385	GTAAG→GTTAG	
C→G	2515	CGCT→CGGT	transversion
	2438	GGCGG→GGGGG	
T→G	2760	ATAT→AGAT	transversion
C→A	2355	CACCCG→CAACCG	transversion
	2396	GACCCG→GAACCG	
G→A	2457	GAAGC→GAAAC	transition
	2460	CAGC→CAAC	
G→C	2555	AGCCG→ACCCG	transversion
	2593	TGCGG→TGCCG	

3 讨论

9-AA 属吖啶(Acridine)类衍生物之一,一般诱导插入或丢失 1~2 个碱基而导致移码突变[4]。其机制是 9-AA 能以两种方式与 DNA 可逆性结合:①带正电荷的吖啶与带负电荷的磷酸基团通过静电引力而结合在 DNA 双螺旋外部;②9-AA 直接插入到碱基中[5,6]。按照移码突变滑动学模型(Slippage model of frameshift mutagenesis),在重复序列尤其是单个碱基组成的重复区内通过滑动错配(Slipped mispairing)产生移码突变[4,6]。大量的研究表明 9-AA 诱发的移码突变以单个碱基丢失为主;突变主要发生在 3 个以上 Gs 重复区域内,即存在突变热点[7~10];少数发生在 T∶A 重复区域内[6]。

本次实验发现 9-AA 诱导移码突变主要发生在同一碱基连续重复区域区,但是并不限于 Gs 或 3 个以上 Gs 重复区域内,而是 4 种碱基发生突变频率较一致;同时,9-AA 能明显诱导碱基置换,与 Conrad 等[4] 研究 9-AA 诱导的 pBR322 DNA 突变结果较一致。我们认为产生这种差异的原因是实验体系的不同所造成的。已有一些体外实验证明培养基中存在的葡萄糖、ATP、ADP、cAMP 等能明显抑制培养基中 9-AA 诱发的移码突变[11,12];说明 9-AA 与 DNA 直接接触与否对实验结果有较大的影响。

9-AA 与 DNA 发生作用时,由于碱基热力学特性以及邻近碱基的相互作用,从而导致相应配对碱基发生突变的频率不同。在本实验中,A 发生移码突变率最高,并且随着重复 As 长度的增加而增加;T 发生移码突变次于 A,与 Conrad 结果一致[4]。但是,Conrad 认为 9-AA 使单个 A 形成突环(loop)较难,因此单个 T 丢失较难,而我们发现有 1.6%的 T 发生了丢失。单个 G 和单个 C 很少发生移码突变,而 2 个 Gs 区发生移码突变率较高,这是难以用滑动错配模型解释的。因为一般认为至少 3 个 Gs 以上重复才能在双链间产生滑动,而 2Gs 区形成的 C 突环不能导致 G 丢失[4]。

9-AA 诱发的碱基置换主要集中在 G-C 碱基上,与 Conrad 体外实验结果一致[4];碱基转换主要发生在 G 上;而 A、T、C 碱基未发生转换。总体的原因可能是 9-AA 与 G 具有较高亲合力的缘故。Shearman 等[13] 研究发现吖啶类物质对 DNA 复制的高保真具明显影响。他们认为吖啶类物质可以与 DNA 聚合酶形成二聚体或与 DNA 聚合酶、模板形成复合物,在 DNA 复制时通过碱基错误掺入(Misincorporation)而引起碱基置换。9-AA亦可能通过插入到双链中与模板形成复合物而导致碱基置换。

综上所述,利用含 LacZ 靶基因的 λgt11 DNA 体外重包装致突变检测系统在检测化合物遗传毒性是可行的,而且它具有以下特点:①灵敏度高,所需化合物剂量低;②直接采用化合物与 DNA 作用,更容易评价化合物对 DNA 的直接损伤;③根据 LacZ 靶基因的突变而评价化合物遗传毒性,避免了假阳性[1];④通过分析 LacZ 靶基因的改变,可以深入研究化合物的分子致突变机制。当然,本系统仍是属于微生物体外检测体系,适宜作为化合物遗传毒性初步评价,尤其是对于间接致突物的评价,目前还未进行,因此需要引入体外代谢活化系统 S9 进一步评价该检测系统的可行性,并逐渐完善该检测系统。

参考文献:

[1] 曹 佳,曹 阳,许丽萍,等.λ DNA 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.

[2] 吴 涛,曹 佳,钱 频,等.ENU 诱导带 LacZ 靶基因的 λgt11 DNA 突变分子机理的研究[J].遗传,1999,21(1):19-22.

[3] 曹 佳,曹 阳,许丽萍,等.λ DNA 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.

[4] Hoffman G R, Deschenes S M, Manjin T, *et al*. Mutagenicity of acridines in a reversion assay based on tetracycline resistance in plasmid pBR322 in Escherichia coli[J]. Mut Res, 1996, 351(1): 33-43.

[5] Ferguson L R, Denny W A. The genetic toxicology of acridines[J]. Mut Res, 1991, 258(2): 123-160.

[6] Conrad M, Topal M D. Induction of deletion and insertion mutations by 9-Aminoacridine[J]. J Biol Chem, 1986, 261(4): 16 226-16 232.

[7] Gordon A J E, Halliday J A, Horsfall M J, *et al*. Spontaneous and 9-Aminoacridine-induced frameshift mutagensis: secondsite frameshift mutation within the N-terminal region of the lacI gene of Escherichia coli[J]. Mol Gen Genet, 1991, 227(2): 160-164.

[8] Rene B, Auclair C, Fuchs R P P, *et al*. Frameshift mutagensis in Escherichia by reversible DNA intercalators: sequence specificity[J]. Mut Res, 1988, 202(1): 35-43.

[9] Skopek T R, Hutchinson F. Frameshift mutagenesis of lambda prophage by 9-Aminoacridine, proflavin and ICR-191[J]. Mol Gen Genet, 1984, 195(4): 418-423.

[10] Pons F W. Genetic analysis of clear-plaque mutations induced in bacteriophage lambda by 9-Aminoacridine[J]. Mut Res, 1984, 129(4): 311-317.

[11] Shearman C W, Forgette M M, Loeb L A. On the fidelity of DNA replication[J]. J Biol Chem, 1983, 258(6): 4 485-4 491.

[12] Kopsidas G, Macphee D G. Mutagenesis by 9-Aminoacridine in Salmonella typhimurium: inhibition by glucose and other PTS class A carbon sources[J]. Mut Res, 1994, 306(2): 111-117.

[13] Kopisidas G, Macphec D G. Frameshift mutagenesis by 9-Aminoacrideine: antimutagenic effects of adenosine compounds[J]. Mut Ras, 1996, 352(1): 135-142.

(编辑 陈聪连)

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