

分子生物学技术在遗传毒理学中的应用

方福德 高惠兰¹

中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005

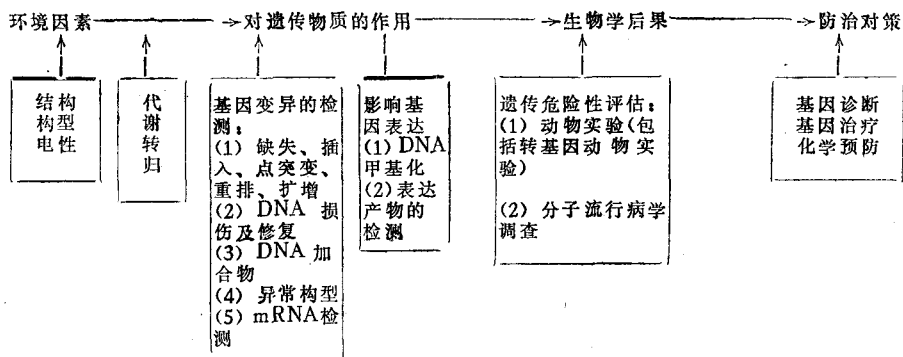
中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所 北京 100050

遗传毒理学是一门年轻的分支学科, 仅为 20 多年的发展历史。在过去的 20 几年中, 正逢分子生物学鼎盛发展时期, 她以 DNA 重组技术所获得的巨大成就有力地促进了生命科学各学科之间的相互渗透和交流, 从而使研究推向分子水平并逐步深入。遗传毒理学亦不例外, 她已经并正在继续借鉴和应用分子生物学理论和技术来解决传统遗传毒理学难以解决的问题, 这里拟简要介绍一些主要的情况。

1. 分子生物学技术在遗传毒理学中的应用范围

众所周知, 遗传毒理学的主要任务是研究内外环境中化学、物理和生物因素对生物体遗传物质的作用及此种相互作用所产生的生物学效应(后果), 并对有害作用提出建立防治对策。我们可以把上述任务分解成 4 个

方面的工作内容: (1) 环境因素(致突、致癌、致畸物等)本身的结构特点及其在生物体内的代谢、转归, 以探讨其结构与功能的关系; (2) 环境因素对遗传物质(DNA 分子、(基因))的作用, 其中最重要的是: 环境因素使基因产生变异并影响基因的表达。因此如何快速、高效检测这些作用的存在已成为现阶段分子遗传毒理学的主要研究内容之一; (3) 环境因素与遗传物质相互作用所产生的生物学效应和后果, 是人们最为关注的, 它涉及遗传危险性评估问题, 目前, 无论在理论和实际上, 仍然是 1 个复杂艰巨的难题, 如环境因素作用的阈值确定, 致突与致癌的关系及致癌机理等。诸如这些方面正在从不同角度对其进行研究。(4) 对环境因素造成的有害作用的防治。所有这些, 均可运用分子生物学技术这一手段予以探讨研究。兹将该技术的应用范围归纳于下:



2. 分子生物学技术在遗传毒理学中的实际应用

环境因素对生物体产生一定的效应(后果)是 1 个复杂的环境—遗传相互作用过程。但无论何种作用方式必定涉及予特定的基

因。从目前报道资料看，环境致癌中约有80%发生基因结构上的变异，即使那些不产生基因结构变异的致癌物，也会通过“基因外作用”途径，最终影响特定基因的表达功能。因此在研究环境因素与遗传物质的相互作用时，首要的问题是检测到这些作用方式的存在。通常认为，在一定的实验系统中，被研究的DNA或基因(称为目标基因或靶基因)经环境因素作用后，通过直接检测其结构或表达功能有无改变，便可判断其是否具有遗传毒作用。

2.1 基因变异的检测

2.1.1 化学物与DNA结合的定性测定⁽¹⁾

测定方法很多，最普遍且较简易用于定性确定此种结合作用的当推光谱移动法。即在试管或细胞系统中，加入待测化学物以与DNA发生作用，再将DNA抽提出来，测其紫外吸收光谱，看是否发生位移，发生位移者说明DNA分子结合了待测化学物或其代谢物。在试管实验中同样可以测定待测化学物的吸收光谱移动与否。此外，若待测化学物具有特征荧光光谱，也可测定其位移与否。需经代谢活化的化学物应添加S9或相应的转化系统。

2.1.2 基因1级结构改变的检测

基因1级结构改变包括大片段缺失和插入小片段缺失和插入、基因重排、基因放大和点突变等类型，环境因素可造成所有这些类型的改变。检测的方法主要有：

① Southern 印迹杂交法：DNA用限制性内切酶酶解，印迹转移至硝酸纤维素膜上，经变性、中和后与³²P标记的基因探针进行分子杂交，如果待测基因结构上发生了大片段插入、缺失、重排或放大，则杂交图谱发生相应改变。如果点突变和小片段插入或缺失恰好发生在限制酶识别位点，同样可用该法测知。因此此法为用途很广的常规方法。

② 变性梯度凝胶电泳法^(2,3)：该法可检测基因的单碱基改变、缺失、插入或错配。其原理是：DNA双链片段含有不同的融解区域(melting domain)通常0.1—1kb片段含有2—5个这样的区域。当这种片段在变性梯度凝胶(由梯度聚丙烯酰胺和脲、甲酰胺组成)中电泳时，其泳动度取决于构型(螺旋双链比分叉双链及单链泳动为快)，其融解温度(T_m)取决于碱基序列。当1双链DNA片断泳动至相当于其最低融解区域的梯度胶位置时，这个区域即解链，成为分叉双链DNA片段，此时它就停滞在该凝胶梯度处。故野生型DNA酶解片段按分子量大小在一线性梯度上依次停滞。如果DNA片段上发生碱基改变，则会改变融解区域的T_m值，从而在不同于相对应野生型片段所在梯度胶的位置上停滞。停滞位置的改变可用标记探针的放射自显影显示出来(图1)。

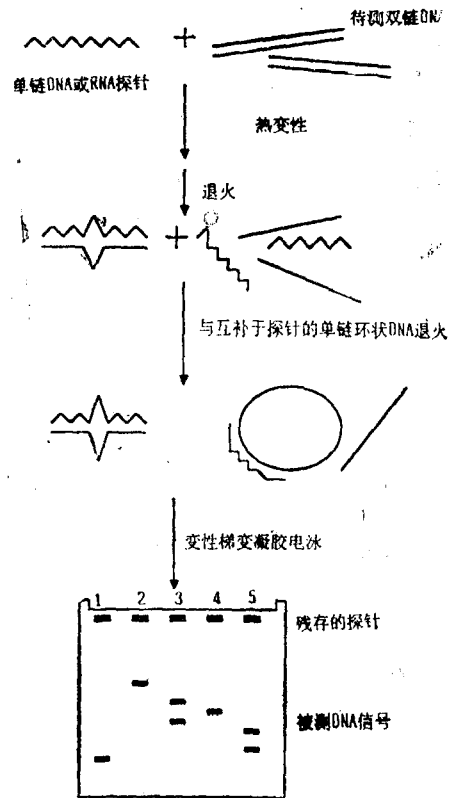


图1 变性梯度凝胶电泳
1, 野生型DNA片段 2-5, 突变DNA片段

③ Rnase A 断裂法 (Ribonuclease cleavage)^(2,4): 该法原理是: 利用体外 SP6 系统合成的RNA探针与突变基因形成 RNA; DNA 杂交体时突变点处不能产生 配对, 此处即相当于局部单链, 可被Rnase A 切割, 经测序胶分离, 由自显影带的数目和长度可推知是否发生点突变及突变点的大概位置, 如图 2 所示:

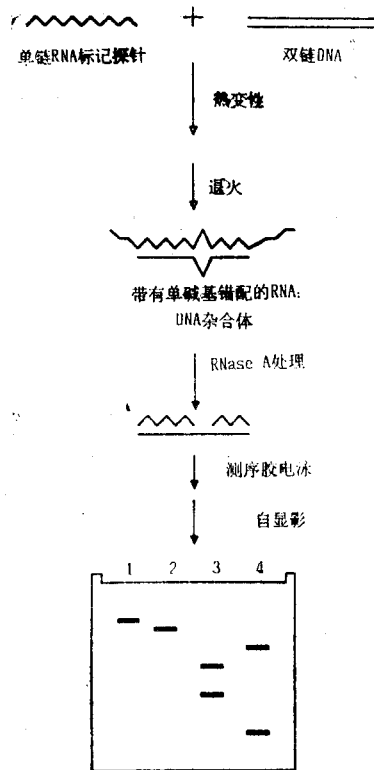


图 2 Rnase A 断裂法

1. 探针 2. 野生型 3,4. 突变体

④ 寡核苷酸探针法⁽⁵⁾: 该法用于检测点突变, 其前提是必须预先知道突变位点, 若某种疾病或某种化学物引起的点突变位点比较固定, 即可应用此法。具体做法是, 合成 1 对寡核苷酸, 其中 1 个与正常基因序列相互补, 另 1 个与具有点突变基因序列相互补, 在 Southern 印迹杂交或斑点杂交中, 这 2 个寡核苷酸探针分别只能与正常序列和有点突变的序列杂交, 2 者很容易区分开来。寡核苷酸采用末端标记, 可得到高比活

的探针。

⑤ 多聚酶链反应法 (Polymerase chain reaction, PCR): PCR 法是 1985 年创立的 1 种分子生物学新技术⁽⁶⁾, 由于其灵敏, 快速, 所需标本量少, 对模板 DNA 质量要求低和应用面广等特点, 被视为革命性技术而风靡科学界。PCR 的原理实际上是模拟 DNA 复制过程, 只是把复制过程放在试管中进行, 并且有目的地用 1 对引物和耐热的 DNA 聚合酶 (Taq) 不断复制出特定的基因片段。PCR 包括 3 个步骤: a 模板 DNA 的热变性; b 引物与模板的退火; c 引物延伸。这 3 个步骤称为 1 个循环, 经过 1 个循环, 模板由于复制其数量增加 1 倍, 这样经过 20-30 个循环, 就可把模板数量增至百万倍以上 (PCR 反应随循环次数增加其效率逐渐降低, 并出现“平台效应”, 即到一定循环次数后模板数量不再增加或增加甚少), 所以 PCR 技术也叫 DNA 扩增技术。其原理示意于图 3。

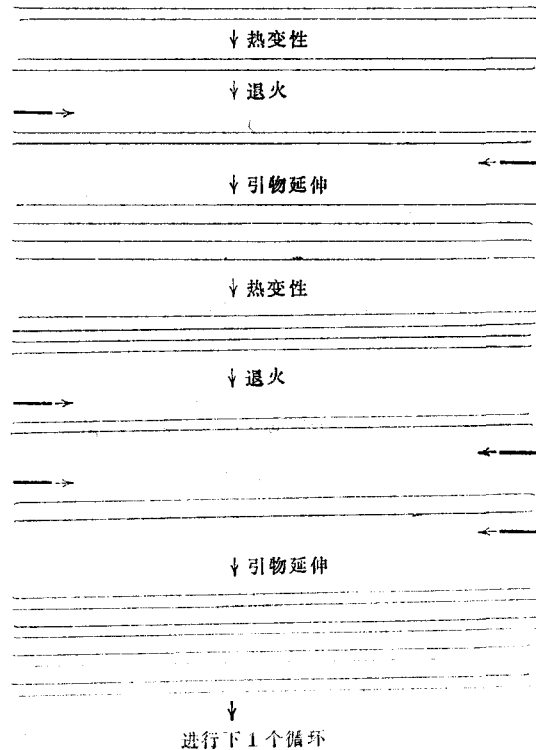


图 3 PCR 基本原理

利用 PCR 技术, 可将任何 1 段感兴趣的 DNA 片段或基因片段扩增至足够数量, 供结构分析之用。也可进行分子克隆。但 PCR 技术中合成引物的先决条件是必须事先知道模板 DNA 或其 1 部分的序列。下面介绍几种检测基因变异的 PCR 法。

1. 基因缺失的检测: 合成 1 对与缺失序列互补的引物, 有基因缺失时, 无扩增带。扩增产物经电泳和 EB 染色后在紫外灯下肉眼即可作观察, 无需同位素标记探针。也可采用几对相应于缺失部位和邻近处的引物进行多位扩增 (Multiplex DNA amplification), 同样可检出基因缺失⁽⁷⁾。

2. 点突变的检测。有以下几种策略:

i. 将含有点突变的 1 段基因片断扩增后, 用标记的寡核苷酸探针作斑点杂交⁽⁸⁾。结果可以判断 2 个等位基因的突变状况, 如果它们都为突变基因, 仅与突变探针杂交, 如果它们之中 1 个正常, 另 1 个带有点突变, 则扩增产物既能与突变探针杂交也能与正常探针杂交。ii. 如果点突变或其它基因变异发生在限制酶识别位点, 扩增含有突变位点的片段后, 可用限制酶酶解, 走琼脂糖凝胶电泳 EB 染色, 紫外光下直接观察染色带长度的变化, 推断是否发生点突变⁽⁹⁾。iii. 几乎所有含单碱基突变的 DNA 片段接上 GC 夹后可用变性梯度胶法检测出来, 如果用 GC 夹引物扩增这 1 片段, 其产物可用电泳和 EB 染色直接检测出来, 无需标记探针⁽¹⁰⁾。除上述策略外, 还有一些设计新颖的方法, 如 PCR 制备正常和突变 DNA 异源双链后用修饰剂对突变点处不配对碱基进行修饰, 然后根据引物延伸产物的长度来判断点突变位置⁽¹¹⁾, 以及扩增阻滞突变体系 (Amplification refractory mutation system) 等⁽¹²⁾。

③ DNA 序列测定: 是了解任何类型基因变异的最准确可靠的方法。目前 DNA 测序的原理主要有 2 类, 即双脱氧末端终止法和化学法断裂法, 这 2 种测序法现已成为

常规方法。但如何达到多快好省地测序目的, 所采用测序策略却多种多样, 如由不对称 PCR 产生单链 DNA 直接测序⁽¹³⁾、逆向 PCR (Inverted PCR) 测序⁽¹⁴⁾、DNA 双链直接测序⁽¹⁵⁾和 Bal31 删除法⁽¹⁶⁾等。

2.1.3 DNA 加合物的检测

亲电子化合物可与 DNA 分子上的亲核基团共价结合而形成加合物, 造成 DNA 损伤。DNA 加合物的检测有助于对某种被研究的化学物质的遗传毒作用或致突、致癌潜力作出评价。检测 DNA 加合物的方法不少, 如荧光分光光度法、HPLC 法、气质谱法、免疫法和 ³²P 后标记法等, 目前以后标记法最为灵敏, 可在 1 个双倍体基因组中检出 1 个加合物。³²P 后标记法最初由 Randerath 等所建立⁽¹⁷⁾, 后经 3 种不同的改进⁽¹⁸⁻²⁰⁾使本底降低, 灵敏度提高。这些方法的原理示意于图 4。

正常状态下亦可发生一定程度上的 DNA 甲基化, 故某些甲基化碱基也是 DNA 的正常成分, 如 5-甲基胞嘧啶 (5mC)。但在外来因素作用下, DNA 甲基化程度可发生改变。化学致癌物引起 DNA 甲基化程度改变的报道已经很多, 通常认为, 这种改变本身不仅意味着基因结构上的改变, 而且更重要的是甲基化程度直接影响特定基因的表达功能。多数实验结果表明, DNA 高度甲基化可降低和阻遏基因表达。其中, C 甲基化的生物学意义最受重视。在基因的调节序列中存在很多 CpG 岛, C 甲基化就发生在此岛中。

检测 CpG 岛甲基化的方法基本上与 Southern 印迹杂交相同, 只是所选择的限制酶对甲基化与非甲基化的 CpG 序列的识别具有差别而已。例如 HhaI 能识别 5'-GCGC 3' 序列, 却不能识别 5'-G₅mCGG-3' 序列, 这样杂交图谱就截然不同了。

此外, HpaII 和 MspI 均能识别 5'-

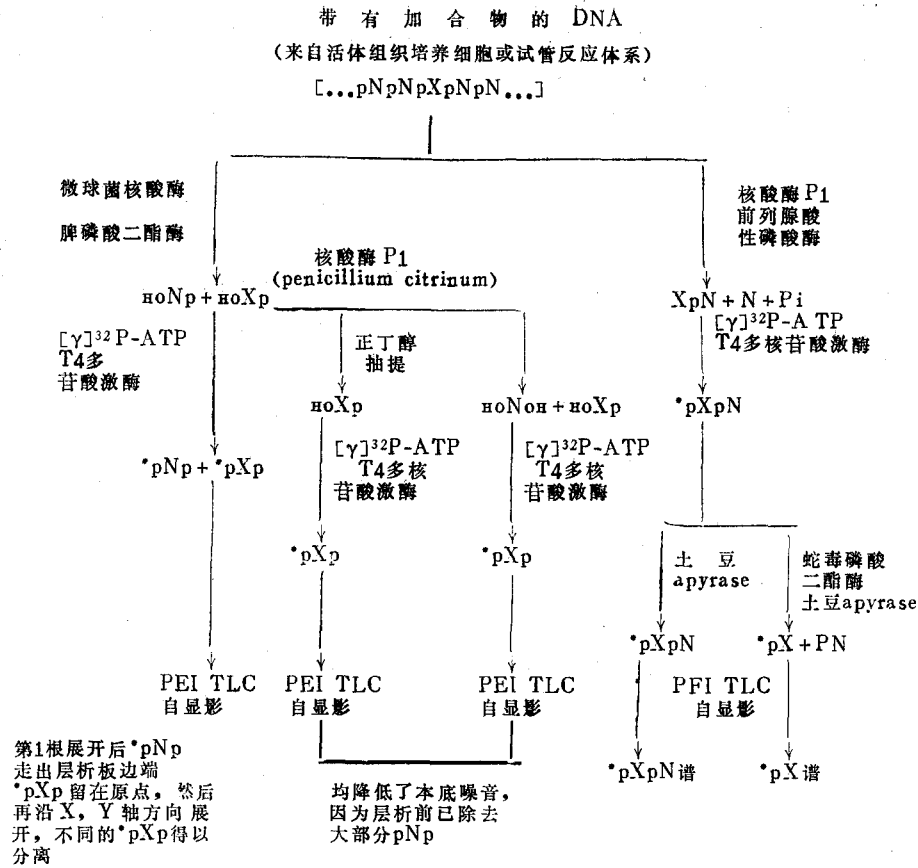


图 4 DNA 加合物的检测

CCGG—3'序列, 在 CG 之间切割, 若 5'—CCGG—3' 被甲基化为 5'—C5mCGG—3', MspI 仍能识别上述切割位点, 而 HpaII 却不能, 利用这 2 个酶的酶切性质的差别可使杂交谱产生差异。

2.1.5 基因表达产物的检测

基因变异后可对其表达产生显著影响, 在表达强度上表现为增强或减弱, 在表达产物方面, 可产生无功能产物, 或功能改变了的产物。所以检测基因表达产物也是研究基因变异的 1 个重要手段。通常用 Northern 印迹杂交检测基因转录产物 mRNA, 用 Western 印迹杂交检测基因终产物蛋白质。这 2 种印迹杂交的基本操作方法与 Southern 印迹杂交类似, 只是检测对象不同罢了, 在 Western 印迹杂交中所使用的探针是抗体(蛋白质),

其本质是蛋白质—蛋白质分子杂交或抗体—抗原反应。Northern 印迹杂交中使用 DNA 探针, 产生 DNA: RNA 杂交体。

2.2 实验系统

为了证明某种环境因素对遗传物质 DNA 是否产生损伤和变异, 以及诱变和致癌机理, 需要设计多种不同的实验系统或模型。迄今已被使用的实验系统主要有以下几类:

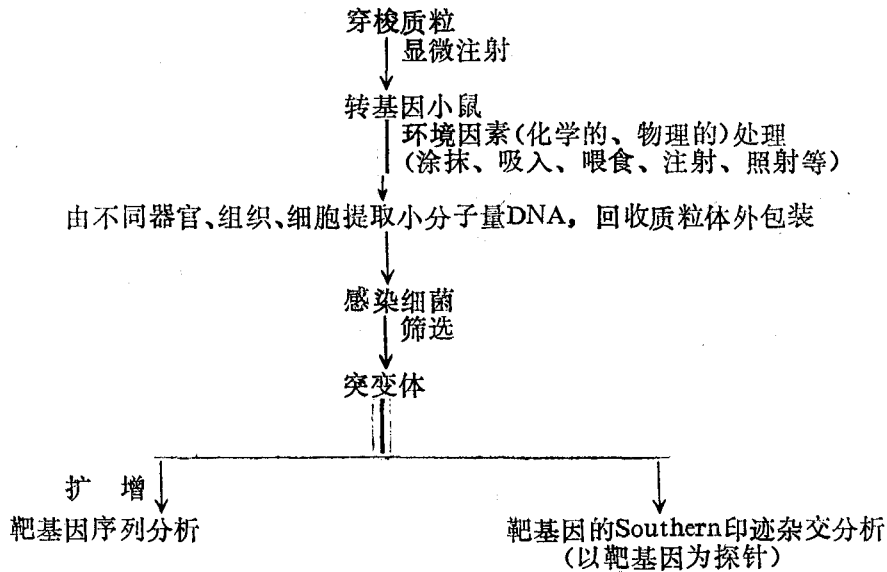
2.2.1 体内实验系统。这一实验系统旨在研究遗传毒物的体内致突变谱。一般步骤是: 先由体细胞筛选突变体, 繁殖突变体, 再由突变体提取基因组 DNA 作 Southern 印迹杂交。突变体的筛选需要确定选择基因, 这样可根据选择基因的特点采取特定的筛选指标。如从人体淋巴细胞筛选次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 hprt 缺乏突变体可由 6—TG

(6-硫鸟嘌呤)抗性作指标,从中国地鼠卵巢细胞(CHO)筛选缺乏双氢叶酸还原酶(DHFR)活性的突变体可以用³H—deoxy-uridine suicide 抗性作指标。在这一实验系统中,通常选择基因同时也是靶基因,故筛得突变体后,可采用 *hprt* 和 DHFR 基因片段作为探针,直接对突变体基因组 DNA 的 *hprt* 基因和 DHFR 基因的突变状况进行分析。不少作者曾用体内实验系统对动物和人在电离辐射环境工作后的基因变异进行了研究^(22, 23), 结果表明:在低剂量电离辐射环境中工作的人(如放射科工作人员),可造成 *hprt* 基因中 2—40kb 片段的缺失和重排。对于 CHO,除造成该基因缺失外,也可产生基因放大现象。射线对 CHO 的 DHFR 基因的作用与上类似。同理,环境化学物对基因的作用也可采用类似方法分析⁽²⁴⁾。但这类实验因未将靶基因分离出来,故无法进行序列测定,如果进行序列测定,则必须经过分子克隆操作后方可实现。

体内实验的 1 种简化形式是不需要预先

筛选突变体,而直接分析某种具有重要生物学意义的基因。如用致癌物诱发动 物肿瘤后,分析肿瘤组织中癌基因的突变激活和抑癌基因的突变失活^(25, 26),在这里肿瘤相当于突变体。有时甚至不需诱发肿瘤,只用一定的环境因素处理动物,然后在不同时间分析某种基因的结构和表达功能有无改变⁽²⁷⁾。人类癌 的分子流行病学调查基本上也可认为属于这种实验类型。

近几年来,转基因小鼠模型作为体内实验系统开始建立和应用。转基因小鼠即外源基因稳定地整合到小鼠基因组的小鼠,可用显微注射法直接将外源基因注射到受精卵的雄性原核中,植入假孕小鼠输卵管而后在子宫发育而成。由于外源基因(靶基因)稳定地整合到小鼠基因组中,用环境因素处理转基因小鼠就可以分析靶基因的变异情况。为了使外源基因能容易地从转基因小鼠组织细胞中回收并扩增,需将其重组在穿梭质粒载体中。整个操作步骤包括:



利用穿梭质粒制备转基因小鼠研究体内基因突变具有一些突出的优点:(1)由于外源基因被转移至受精卵中并在卵分裂前就被整合至基因组DNA中,故转基因小鼠经环境

遗传毒物质作用后,可比较研究不同器官、组织和细胞外源基因的突变频率和类型,从而可评价其遗传毒效应的异同。(2)由于外源基因被重组在穿梭质粒载体中,回收、扩

增和序列测定均易进行。迄今几项比较著名的实验是以大肠杆菌 LacZ 和 SupF 基因为靶基因构建的穿梭质粒制备转基因小鼠, 研究多种化学致突物、致癌物及射线等对基因的变异作用、靶组织的特异性以及剂量—突变关系^(28, 29)。结果表明, 不同致突物和致癌物对同一器官、组织中靶基因的变异类型和频率不尽相同, 同一致突物或致癌物对不同器官、组织靶基因的变异情况亦不一样。紫外线引起的突变大多为 C—T 转换。

2.2.2 细胞实验系统

在培养细胞中进行诱变研究具有快速、方便及可人为控制条件等优点。这里主要介绍 3 个实验系统。

① 穿梭质粒系统。

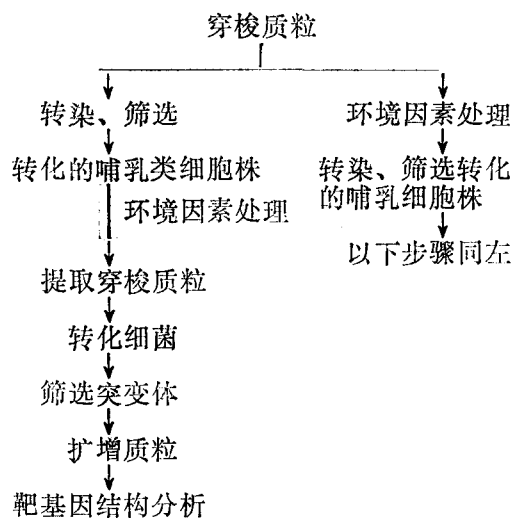
穿梭质粒主要由病毒基因组的部分序列(启动子、增强子、复制与转录起始点等)、质粒的部分序列(复制起始点及抗性基因等)、靶基因和选择基因构建而成, 体外包装后具有病毒的感染性, 同时具有质粒的性质, 故其既可在哺乳类细胞中复制, 又可在细菌细胞中增殖, 不难看出, 穿梭质粒的这一特点可被用来研究环境因素的遗传毒作用, 因为我们可以对含有穿梭质粒的哺乳类细胞进行处理, 再把质粒抽提出来, 然后转化细菌, 并在细菌中大量扩增, 对靶基因进行限制酶酶谱分析和序列分析。这样的实验系统接近于自然状态。

穿梭质粒的靶基因可选自哺乳类或细菌的具有一定生物学特性的基因, 目前采用的多来自细菌, 如 LacI(乳糖操纵子调节基因)、LacZ(半乳糖苷酶基因)、gpt(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因)、SupF(tRNA 琥珀突变抑制基因), neo(氨基葡萄糖苷 3'-磷酸转移酶基因)和 XyLE(邻苯二酚氧化酶基因)等。靶基因一般选择长度较短, 限制酶切点较少和序列已知者为宜, 因为这样的靶基因容易进行限制酶酶谱分析和序列分析。为减少自发突变发生, 在构建穿

梭质粒时应将靶基因重组在离复制起始区尽可能靠近处。

穿梭质粒在哺乳类细胞中的增殖方式有 2 种, 1 种是在染色体 DNA 之外进行自主复制, 这样质粒可随细胞传代而传代下去, 环境因素对宿主 DNA 和质粒 DNA 的作用是分别进行的。另 1 种是穿梭质粒以前病毒形式稳定地整合到宿主基因组 DNA 之中, 与细胞 DNA 一起复制, 故可建立稳定的转化细胞系, 环境因素对宿主 DNA 和质粒 DNA 的作用是同时进行的。这 2 类穿梭质粒都能说明环境因素对活细胞的遗传毒效应。真正比较好地利用穿梭质粒系统研究基因诱变作用始于 80 年代中期。当时对于射线、环境诱变剂和致癌物引起基因突变的类型和特异性均已有不少研究成果⁽³⁰⁻³⁵⁾。国内在近几年也开始开展这方面工作^(36, 37)。

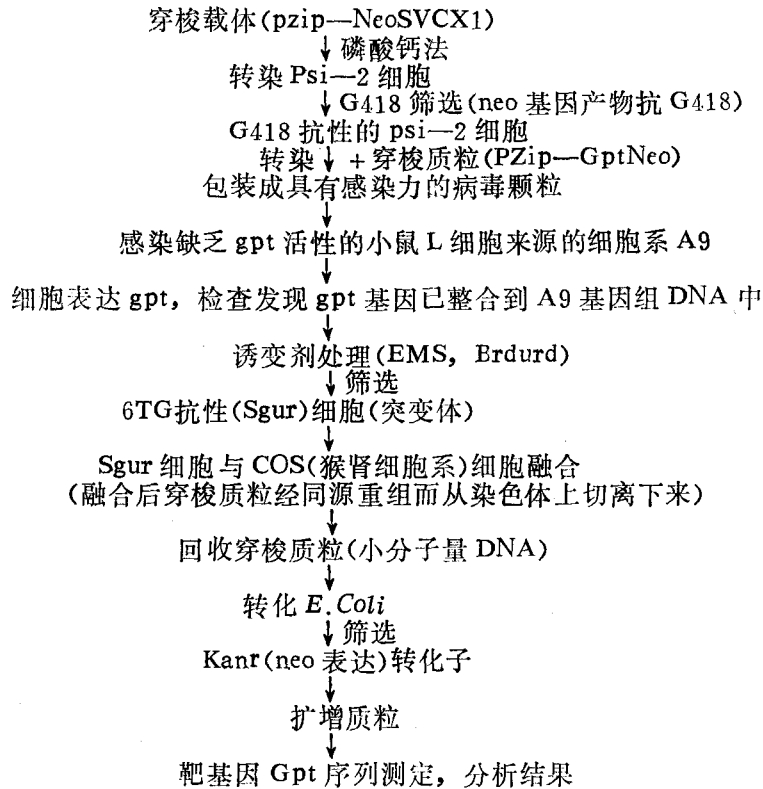
采用穿梭质粒系统研究基因突变的一般方法步骤是: 构建 1 个穿梭质粒或采用他人已构建好的穿梭质粒, 通过体外包装成为具有感染力的质粒或采用电穿孔的方法⁽³⁸⁾ 转染哺乳类细胞, 细胞用待测物处理, 提取质粒, 再转化细菌, 筛出突变体, 作酶谱分析和序列分析。兹归纳于下:



实际上, 采用不同的穿梭质粒由于所带选择基因及复制形式的不同, 所采用的筛选

方法和回收方法也不同。下面具体介绍 1 个实例，系 Ashman 等⁽²⁶⁾采用穿梭质粒 PZip—Gpt Neo(Gpt 即 gpt，为靶基因，Neo 为

选择基因)研究诱变剂的作用。整个过程如下：



通过上述分析，证明 EMS 或 Brdurd 对靶基因造成的突变主要为单碱基置换和 34bp 的缺失，其缺失的是短的重复序列 5'-TGATGA'-3'故认为这些重复序列是诱变剂作用的热点区域。

对于自主复制型穿梭质粒，回收比整合型穿梭质粒容易得多，常规使用 Hirt 法⁽³⁸⁾提取即可。

若靶基因或选择基因的表达产物能产生颜色反应，则可很方便地利用颜色变化来筛选转化子或突变体。如正常 LacI 基因产物使底物 X-gal 产生白色，若该基因发生了突变，则菌落颜色变为蓝色，故凡是蓝色菌落皆为突变体。相反，LacZ 基因产物的呈色反应为：野生型蓝色，突变型白色透明。XylE 基因产物对底物邻苯二酚呈色反应

为：野生型白色，突变型为深黄色⁽³⁷⁾。

② 改良的 Ames 试验体系⁽³⁹⁾

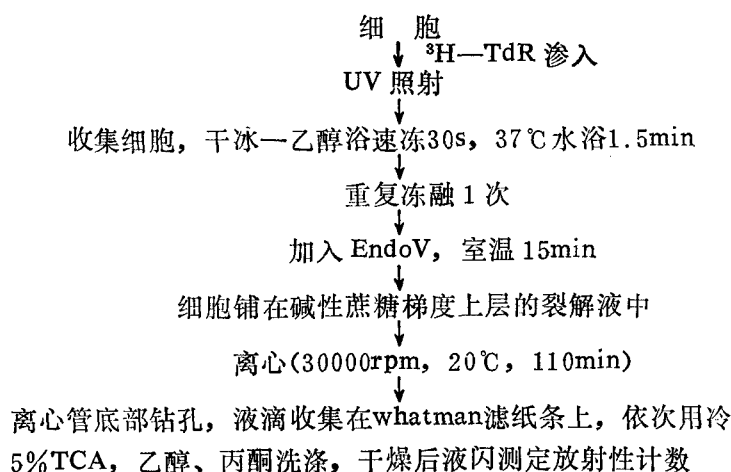
经典 Ames 试验是广泛用于检测环境诱变剂的方法。运用此法已证明，80% 以上的致癌物同时具有诱变性。但致癌物中有 1 种类型—化学氧化物却不能用 Ames 法检出诱变性。这说明经典 Ames 法有一定的应用限度。为克服此弊，Ames 实验室在原法的基础上作了改进，使之应用范围进一步扩大。他们从 70 个组氨酸依赖性突变体中筛选到 1 株对氧化物最敏感的菌株 hisG428，它具有赭石型突变，回复突变位点为 A：T，同时它还含有 rfa 突变(能增加大分子向细胞内渗透)。为了增加回复突变的敏感性，向该菌株引入具有 hisG428 突变的多拷贝质粒 PAQ1 和能赋予错误倾向修复的 R 因子抗性

质粒 PKM101, 以便创造更多的回复突变的位点和机会。作者用此法对 10 几种化学诱变剂和射线进行了检测, 证明能特异地检测氧化物的诱变性及其它一些在经典 Ames 试验中不能检出的诱变性。

③ DNA 损伤的修复 —— EndoV 检测体系

近年来, 以 EndoV 酶探针为基础建立的 DNA 损伤修复的检测方法受到了重视, 并已被应用于嘧啶二聚体的切除修复研究。

EndoV 是 1 种来源于 T4 噬菌体的内切酶, 能特异地识别嘧啶二聚体(PD), 并在该部位切断核糖与碱基之间的糖苷键。所以该酶是嘧啶二聚体-DNA 糖苷酶(Pyrimidine dimer-DNA glycosylase)。由于对 PD 处糖苷键的切断是切除修复的第 1 个步骤, 故该酶也属于修复酶类。又由于 PD 位点对 EndoV 敏感, 故 EndoV 检测也叫 ESS 法(endo-nuclease-sensitive site)。ESS 法的操作如下:



结果分析步骤是: (1) 根据滤纸条的放射性计数, 画出放射性图谱, 由图谱计算 DNA 片段的平均分子量 $M_n^{(40)}$ 。(2) 根据 M_n 值计算 ESS 数目:

$$\text{ESS 数目/每道尔顿} = \frac{1}{M_n(\text{酶处理组})} - \frac{1}{M_n(\text{未处理组})}$$

有人用此法对着色性干皮病细胞进行测定, 结果未能检出 ESS, 说明该种细胞确实缺乏切除修复能力, 而且丧失了修复的启动能力。也有人观察到 AAF 产生 DNA 加合物(在 G 上)后, 使 ESS 数目减少, 且与加合物的形成量呈负相关, 这表明致癌物修饰的碱基会干扰 PD 切除修复的启动⁽⁴¹⁾。

如将 EndoV 检测与 Southern 印迹杂交法结合运用, 可探测特定基因区域的修复状

态^(42, 43), 其方法是:



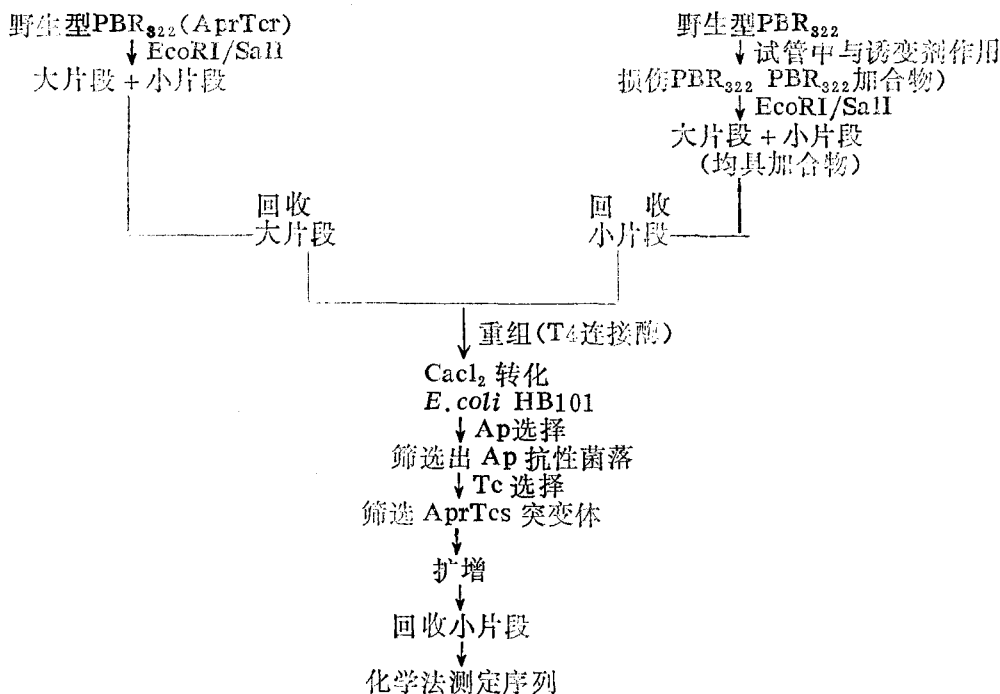
应用此方法, Bohr 等研究了 CHO 细胞双氢叶酸还原酶(DHFR)基因的 1 个 14.1kb

片段PD的切除修复情况,观察到:经UV照射和 EndoV 作用后,该基因片段放射性明显减少,其减少程度与UV照射剂量成正比关系,这是由于该片段上PD位点被 EndoV 切割后形成了小片段之故。如果UV照射后细胞保温一段时间,则PD被切除,修复得以启动和完成,ESS数目减少14.1kb片段的放射性逐渐恢复(增高)。结果表明:DEFR 基因片段中 2/3 的 PD 被移除,而该基因 5'上游区只有少量 PD 被移除,整个基因组 DNA 中的 PD 被移除的平均值为 10—15%。这说明人类和哺乳类细胞DNA的不同区域其修复程度是不相同的,此即所谓修复的不均一性,这是近年来对 DNA 修复机理

的新认识。另外作者也相继报道^(44, 45),具有转录活性和处于活跃状态的基因能被优先修复,这也是修复不均一性的有力证明。

2.2.3 试管—细胞实验系统

这个实验系统最具代表性的例子是利用质粒 PBR322 的所谓定向突变检测(forward mutation assay)研究环境诱变^(46, 48)。其主要步骤是,首先在试管中用诱变剂作用于质粒,使质粒产生损伤(形成加合物,嘧啶二聚体或其它损伤链断裂),然后将作用后的质粒转移至感受态宿主菌细胞内,经过复制和增殖形成稳定的表型改变后,筛选突变体,扩增后回收靶基因片段进行结构分析。具体操作步骤概括如下:

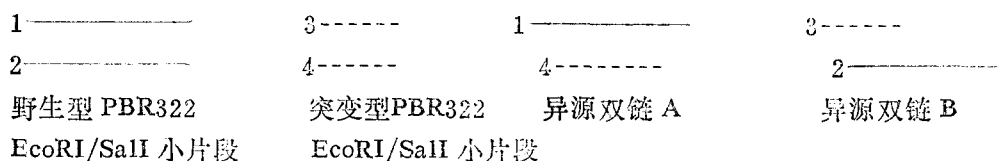


Fuchs 实验室采用此法,研究了多种化学致癌物和顺铂的诱变性、诱变机理以及形成加合物的位点与突变位点的关系。作者把 AAF 先用 ³H 标记,这样试管反应完毕后可对质粒结合 ³H-AAF 的程度及加合物结合位点进行测定。待序列测定后,将加合物结合位点与碱基突变位点加以对照比较,这对于阐明致突机理颇为有用。结果表明,AAF

若与鸟嘌呤 C8 位结合形成加合物,可破坏双螺旋DNA的局部构型,使其膨出,这相当于局部变性,故 Fuchs 等据此提出了诱变剂“插入变性模式”(insertion-denaturation-model),该模式认为某些诱变剂与碱基的一定位置结合所产生的局部变性会致使复制时发生障碍,从而出现错配或碱基缺失。Fuchs 等还发现 AAF-DNA/加合物的形

成亦可使局部构型由右旋改变为左旋(AF-DNA 加合物无此性质),使其变为不稳定,因此作者又提出“Z-DNA 诱导”假说(induction of a Z-DNA structure),作为解释诱变机理的 1 种看法。实际上从现在的报道资料来看,有 1 类诱变剂产生突变的位

点与其形成加合物的位点并不一致,从这种情况可推断还存在其它发生机制。令人感兴趣的是:如果将野生型和突变型 PBR₃₂₂ 的 EcoRI/SalI 小片段分别经变性处理后聚丙烯酰胺凝胶电泳将 2 条链分离开来,回收后再分别两两组成异源双链:



把这些异源双链与野生型 PBR₃₂₂ EcoRI/SalI 大片段重组后转化受体菌,发现这些异源双链在细胞内复制时优先复制野生链而较少复制突变链,序列测定表明突变频率大为减少。所以 DNA 如果只有单链损伤,其后果比双链损伤轻微得多。

我们实验室在此法基础上,作了一些改变(如采用双链 DNA 直接测序等),在精确的阳性与阴性对照下,证明了新诱变剂 GMA 的诱变性,诱导基因突变的类型及诱变的序列专一性等^(49,50)。

试管反应的优点是诱变剂与 DNA 直接接触,作用效率高,诱变率也高,如果结合对受体菌加以某种处理(如 UV 照射)使产生 SOS 修复反应,则诱变频率会更高,有助于基因分析工作。但试管反应系统是离体的,解释结果时要谨慎。

3. 分子生物学技术在遗传毒理学研究中的意义

遗传毒理学要解决的中心问题是环境因素对人类造成遗传损伤和危害的可能性,即遗传危险性的问题。评价遗传危险性的因素主要有 2 个,1 是环境因素对遗传物质的作用能力(造成基因突变并遗传),2 是在自然条件下环境因素对遗传物质的作用能力。遗传危险性就是这 2 个因素的乘积。目前评价遗传危险性的试验有 3 种:体外试验、动物

整体实验和分子流行病学调查。这些试验方法存在 2 个很难克服的问题:(1)难以精确确定某一环境因素造成的遗传负荷和后果,特别难以确定自然条件下的“背景噪声”或基线。(2)体外和动物实验系统由于其修复能力、代谢动力学、环境因素与遗传物质的亲和力、作用的靶部位及复制等与人类细胞存在差异,加之实验在小样本、高剂量的条件下进行以及处理数据的统计学方法的不同,在将实验结果推论到人类时常容易发生问题。分子生物学技术可避免以上种种不利因素,给出的是环境因素造成靶基因上的特异性变异这一分子标记,因此,可较为理想地研究这种分子标记与遗传的关系及与各种疾病的关系,以及致突与致癌的关系。这就是说,在分子水平上,大家有共同的“标记”或指标,也就有了“共同语言”。这样,研究环境因素作用的“背景噪声”和阈值也有了可能。此外,遗传毒理学中对环境诱变剂和致癌物作用“剂量”的概念通常是指浓度与时间的乘积,由于各种可变因素的存在,这种“剂量”是不够准确的。若以反应产物作为定量标准(如靶基因点突变和其它突变的数量、特异及持久性 DNA 加合物的存在量、DNA 甲基化程度和基因表达水平等等),则作用剂量更为准确,这就是“分子剂量”概念。基于分子生物学技术研究遗传毒理学问题具有上述的特点与优势,使近年来分子流行病学

调查悄然兴起。分子流调就是以某些已知具有重要或特殊功能的靶基因的变异(特别是特异性变异)为指标,从流行病学角度探讨环境因素——基因变异——疾病三者之间的定性和定量关系,例如癌分子流调、糖尿病分子流调等等。

应用分子生物学技术也给遗传毒理学的理论研究带来新气象,其中最值得一提的是化学致癌机理以及致突与致癌的关系的研究。在这些研究中,被选择的靶基因大多是癌基因和抑癌基因。现已有大量资料表明:致癌物能够通过多种多样基因突变方式引起细胞原癌基因的结构变异及表达的激活,且在细胞癌变过程的不同阶段,不同的原癌基因的结构或表达发生改变,此即所谓多种癌基因改变产生1种癌假说,因此,如果搞清楚不同类型已知致癌物诱癌过程中的癌基因谱,不仅有助于进一步认识癌变的分子机理,也可为致癌物的分子分类和简易检测提供理论基础。最近几年来,有关抑癌基因的研究成果显示:在细胞癌变中,仅有原癌基因的激活不足以引起癌变,必须同时出现抑癌基因失活才有可能引起癌变。最初在儿童视网膜母细胞瘤的研究中发现,抑癌基因RB在患者生前即已有1个等位基因缺失失活,出生后在一定环境因素作用下,另1个等位基因也发生了缺失失活,因而整个RB基因失活。由此提出了基因2次突变致癌的假说。现在已有不少资料表明:抑癌基因在一些环境因素作用下可发生各种形式的突变失活。通常倾向于认为:细胞由单独癌基因激活不一定会致癌,但单独抑癌基因失活则有可能致癌。

在实际应用上,正如上面所介绍的,分子生物学技术已为诱变分子机理研究提供了技术保证。分子生物学技术的应用为快速简便地检测环境诱变剂提供了许多新途径。除此之外,由于对环境因素——遗传——疾病关系的不断深入的了解,有可能在分子水平

上对疾病、突变和癌变提出防治对策,如基因诊断,基因治疗和化学预防等,这些方面目前也有丰富的材料,限于篇幅不拟赘述。

参考文献

1. Xie DY, et al, Studies of the genotoxicity of glycidyl Methacrylate (GMA). *Biomed Environ, Sci*, 1990; 3: 281.
2. Myers RM, et al, Detection of Single Base Substitutions by Ribonuclease Cleavage at Mismatches in RNA:DNA Duplexes. *Science* 1985; 230: 1242.
3. Myers RM, et al, Detection of Single Base Substitutions in Total Genomic DNA. *Nature* 1985; 313: 495.
4. Myers RM, and Maniatis, T, Recent Advances in the Development of Methods for Detecting Single-base Substitutions Associated with Human Genetic Diseases. *Cold Spring Harbor Symp, Quant, Biol.* 1986; 51: 275.
5. Zarbl, H, et al, Direct Mutagenesis of Ha-ras-1 Oncogenes by N-nitroso-N-methylurea During Initiation of Mammary Carcinogenesis in Rats. *Nature* 1985; 315: 382.
6. Saiki RK, et al, Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis For Diagnosis. *Science* 1985; 230: 1350.
7. Chamberlain JS, et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. P272, Eds, Innis, MA et al. Acad. Press, Inc, 1990
8. Saiki RK, et al, Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA Polymerase. *Science* 1988; 239: 487.
9. Chehab FF, et al, Detection of Sickle Cell Anaemia and Thalassemias. *Nature* 1987; 329: 293.
10. Sheffield VC, et al, Attachment of a 40-base-pair G+C-rich Sequence (GC-clamp) to Genomic DNA Fragments by the Polymerase Chain Reaction Results in Improved Detection of Single-base Changes. *Proc. Natl, Acad, Sci, USA*, 1989; 86: 232.

11. Ganguly, A, et al, Detection of Single-base Mutations by Reaction of DNA Heteroduplexes with a Water Soluble Carbodiimide Followed by Primer Extension: Application to Products From the Polymerase Chain Reaction, *Nucleic Acid Res.* 1990; 18: 3933.
12. Old JM, et al, Cypriot Populations in the UK, *Lancet* 1990; 336: 734.
13. Kreitman M, et al, A Strategy for Producing Single-Stranded DNA in the PCR, A Direct Method for Genomic Sequencing, *Gene Anal. Techn.* 1989; 6: 84.
14. Triglia T, et al, A Procedure for in Vitro Amplification of DNA Segments That Lie Outside the Boundaries of Known Sequences, *Nucleic acid Res.* 1988; 16: 8186.
15. 高惠兰等, 双链DNA直接测序, *基础医学与临床* 1991; 11: 247.
16. 方福德, Bal31 删除法测定马传染性贫血病毒表面抗原基因的核苷酸序列, *病毒学报* 1989; 5: 194.
17. Randerath K, et al, ³²P-labeling Test for DNA Damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78: 6126.
18. Gupta RC, Enhanced Sensitivity of ³²P-postlabeling Analysis of Aromatic Carcinogen: DNA Adducts, *Cancer Res.* 1985; 45: 5656.
19. Reddy MV, et al, Nuclease P1-Mediated Enhancement of Sensitivity of ³²P-postlabeling Test For Structurally Diverse DNA Adducts, *Carcinogenesis* 1986; 7: 1543.
20. Randerath K, et al, A New Sensitive ³²P-postlabeling Assay Based on the Specific Enzymatic Conversion of Bulky DNA Lesions to Radiolabeled Dinucleotides and Nucleoside 5'-Monophosphates, *Carcinogenesis.* 1989; 1: 1231.
21. 方福德, DNA 甲基化作用与基因表达的调控, *生理科学进展* 1984; 15: 115.
22. Graf L, et al, Direct Demonstration of Genetic Alterations at the Dihydrofolate Reductase Locus After Gamma Irradiation, *Mol. Cell Biol* 1982; 2: 93.
23. Bradley WEC, et al, Molecular Characterization of 15 Rearrangements Among 90 Human in Vivo Somatic Mutants Shows That Deletions Predominate, *Mol. Cell Biol* 1987; 7: 956.
24. Myhr BC, et al, Chemical Mutagenesis at the Thymidine Kinase Locus in L5178 Mouse Lymphoma cells: Results For 31 Coded Compounds in the National Toxicology Program, *Environ. Mol. Mutagenesis* 1991; 18: 51.
25. Llor X, et al, K-ras Mutation in 1, 2-dimethylhydrazine-induced Colonic Tumor: Effects of Supplemental Dietary Calcium and Vitamin D Deficiency, *Cancer Res* 1991; 51: 4305.
26. Sakai H, et al, Mutational Activation of C-Ha-ras Genes in Intraductal Proliferation induced by N-nitroso-N-methylurea in Rat Mammary Glands, *Int. J. Cancer* 1991; 49: 140.
27. Lu SJ, et al, Preferential Methylation at the Ha-ras Proto-oncogene by Methylnitrosourea in Rat Mammary Glands, *Mol. Carcinogenesis* 1991; 4: 261.
28. Gossen, JA, et al, Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors From Transgenic Mice: A Model for Studying Mutations in Vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 7971.
29. Glazer PF, et al, Detection and Analysis of UV-induced Mutations in Mammalian Cell DNA Using a Page Shuttle Vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 1041.
30. Ashman CR, et al, Efficient Recovery and Sequencing of Mutant Genes From Mammalian Chromosomal DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 3356.
31. Bredberg A, et al, Restricted Ultraviolet Mutational Spectrum in a Shuttle Vector Propagated in Xeroderma Pigmentosum Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 8273.
32. Lebkowski JS, et al, The LacI Shuttle: Rapid Analysis of the Mutagenic Specificity of Ultraviolet Light in Human Cells,

- Proc, Natl, Acad, Sci USA, 1985; 82 : 8606.
33. Dubridge RB, et al, Analysis of Mutation in Human Cells By Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System, *Mol Cell Biol* 1987; 7 : 379.
 34. Moriya M, et al, Targeted Mutations Induced By a Single Acetylaminofluorene DNA Adduct in Mammalian Cells and Bacteria, *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 1586.
 35. Drinkwater NR, et al Chemically Induced Mutagenesis in a Shuttle Vector With a Low Background Mutant Frequency. *Proc. Natl. Acad, Sci, USA*, 1986; 83 : 3402.
 36. 林凡等,应用穿梭质粒建立哺乳动物细胞诱变检测系统的实验研究. *癌变·畸变·突变* 1991; 3(3) : 6.
 37. 王晓利等,带有 XylE 基因的 EB 病毒穿梭质粒 pFDD891 的构建, *癌变·畸变·突变* 1990; 2(1) : 1.
 38. Hirt B, Selective Extraction of Polyoma DNA From Infected Mouse Cell Cultures. *Mol Biol* 1967; 26 : 365.
 39. Levin, DE et al., Detection of Oxidative Mutagens with a New Salmonella Tester Strain (TA102). *Methods in Enzymol.* 1984; 105 : 249.
 40. Rupp WD, et al, Discontinuities in the DNA Synthesized in an Excision-defective Strain of Escherichia coli Following Ultra-violet Irradiation. *J Mol Biol* 1968; 31 : 291.
 41. Duker NJ, et al, Inhibition of Enzymic incision of Thymine Primers By Covalently Bound 2-[N-[(Deoxyguanosin-8-yl) acetyl amino] fluorene in Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* 1985; 24 : 408.
 42. Bohr VA, et al, DNA Repair In An Active Gene : Removal Of Pyrimidine Dimers From The DHFR Gene of CHO Cells Is Much More Efficient Than in The Genome Overall. *Cell* 1985; 40 : 359.
 43. Bohr VA, et al, Survival of UV-irradiated Mammalian Cells Correlates With Efficient DNA Repair in An Essential Gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 : 3830.
 44. Madhani HD, et al, Differential DNA Repair in Transcriptionally Active and Inactive Proto-oncogenes : C-abl and C-mos. *Cell* 1985; 45 : 417.
 45. Okumoto DS, et al, DNA Repair In The Metallothionein Gene Increases With Transcriptional Activation. *Nucl Acid Res* 1987; 15 : 10021.
 46. Fuchs Rpp, et al, in *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amine and nitroarenes*, King, CM et al (Eds.), pp373-384, Elsevier, Sci, publishing Co., Inc, 1988
 47. Koffel-Schwartz N, et al, Specific Strand Loss in N-2-Acetylaminofluorene-imodified DNA. *J Mol Biol* 1987; 193 : 651.
 48. Burnouf D, et al, Spectrum of Cisplatin-induced Mutations in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 : 3758.
 49. Gao HL, et al, Studies on Molecular Level of Mutagenesis Induced By Glycidyl Methacrylate, The Proceeding of the 13th Asia Conference of Occupational Health, 1991. pp25-27.
 50. Xie DY, et al, Analysis of The Phenotype and The Restriction Enzyme Mapping Level of Mutations Induced By The New Mutagen Glycidyl Methacrylate, *Biomed, Environ, Sci*, 1990; 3 : 142.