

## 1-15 几种理化因素诱导的人白血病 HL-60 细胞 HPRT 基因突变频率及分子突变谱的研究

刘胜学 曹佳 (第三军医大学预防医学系分子毒理室 重庆 400038)

目的:HPRT 基因正向突变试验是国内外广泛采用的致突变检测方法。以往进行 HPRT 基因的致突变检测主要有两种方法,即放射自显影法与多核细胞检测法,虽然这两种方法简单、快速,但主要的缺陷是不能进一步确定突变细胞的,这一直是制约 HPRT 基因突变研究深入发展的重要因素。方法:本研究选择了具有不同诱变机理的化合物昆明山海棠 (THH)、丙烯酰胺 (AA)、乙基亚硝基脲 (ENU) 及物理因子  $\gamma$ -射线,采用镜检、单细胞克隆培养、双向筛选计数、多重 PCR 扩增和双电泳分析等多种技术手段对人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞 HPRT 基因的突变发生进行系统研究,以揭示 HL-60 细胞克隆效率与突变频率的变化规律,以及 THH 诱导的 HPRT 基因分子突变谱与突变机理。结果:1. 随着剂量的增加,4 种理化因素均能造成细胞存活率下降,THH、ENU 和 AA 等三种化合物的变化趋势均符合数学模型:  $Y = ae^{bx}$ ,物理因子  $\gamma$ -射线符合模型:  $Y = a + bx$ ,并且与正常对照组比较相差非常显著 ( $P < 0.01$ ),即具有细胞毒性,其中 AA 细胞毒性较大,THH 细胞毒性较小。同时,4 种理化因素均能诱导细胞突变频率升高,而且有明显的剂量反应关系,表明都具有致突变性,其中 THH、ENU 及  $\gamma$ -射线处理细胞的克隆效率与突变频率成负相关,而 AA 为正相关。2. 自发突变与 THH 诱发突变的分子突变谱不一样:自发突变绝大多数是点突变 (92.3%),而诱发突变主要由缺失和点突变两部分组成 (分别为 46.6% 和 53.4%);自发突变无全基因缺失,而诱发突变中全基因缺失占 12.1%,尤其在高剂量组表现明显。3. 比较 HPRT 基因突变位点在各个外显子的分布,可见无明显的差异,不存在突变热点;但如果把整个基因等分为三部分,缺失位点的分布就存在明显的区域性,其中基因内缺失位点的 53% (53/100) 定位在 HPRT 基因 3' 末端的 1/3 区域内,这个比例分别是中段、5' 末端的 1.9 倍和 2.4 倍。4. 缺失可以发生于 HPRT 基因的每个外显子,但外显子 1、7/8、9 未见单独缺失发生,外显子 1 只出现全基因缺失中,外显子 7/8 与外显子 9 多表现为连锁缺失 (71.4%)。结论:通过本研究表明,克隆筛检法结合多重 PCR 技术作为一种深入、系统地研究外来化合物致突变性及其分子突变机理的方法,具有广泛的应用前景。

## 1-16 精子荧光原位杂交试验技术上的注意点

邓丽霞 郑履康 张桥 (中山医科大学公共卫生学院 遗传毒理研究室 广州 510089)

非整倍体与流产、畸形、智力低下及肿瘤的发生均有关系,测定接触化学物质生殖细胞非整倍体对了解化学物毒理,保护接触人员及下一代健康都有重要意义。我室自 1996 年建立荧光原位杂交法,并用此法检测了 36 万组精子。现将我们在试验中的点滴经验介绍于下:

标本制作及老化,精液经 Tirs NaCl 三次离心洗涤后,将精子浓度配成  $10^7/ml$  精子,均匀涂于载玻片上约  $1.5cm^2$ ,精子总数大于一万,标本于室温老化 20h 以上。杂交前处理是杂交成功和提高杂交效率的关键步骤。(1) 0.1% 吐温处理主要是去除细胞膜层的脂肪,处理后细胞无增大或变薄。(2) 经 10mmol 二硫苏糖醇 (DTT) 处理后,细胞稍增大变薄,DTT 与二碘水杨酸锂 (LiS) 主要是使精子头去凝集,使 DNA 链变松和暴露,LiS 的处理时间范围较大 (0.5 ~ 3h),标本老化在 20 ~ 72h 内,处理时间较易控制 (20 ~ 72h),这过程在镜下见细胞明显变薄和胀大,胀大约 2 倍为宜,但细胞边缘清楚并完整,变薄的感觉是细胞的成像变淡。变薄和胀大不够探针不能穿透是杂交不上,细胞变薄和胀大过甚,DNA 链过松,杂交后荧光点松散,非特异性杂交增加使结果难以判断。计数染色体双体率有明显误差。RNA 酶 (100 $\mu$ I/ml) 是去除 RNA,使 DNA 链更加暴露并减少非特异性杂交。原位杂交:将精子标本与杂交探针分别变性,按试剂盒说明温度与时间范围,一般影响不大。杂交后洗涤:杂交后的洗涤影响着非特异性杂交信号和背景的效果,温度控制在一定范围内,洗涤的次数时间足够,甲酰胺的新鲜程度也为重要。信号检测:免疫反应中抗原抗体结合,抗体与抗原的比例要适合,温度与时间要控制好,用于配抗体的含有阻断剂的硫酸缓冲液 (PMN) 与磷酸缓冲液 (PBD) 的  $P^H$  值调节在 8.0,因荧光素在弱碱性更为稳定,信号检测操作过程在暗环境中进行,以保持杂交信号中的荧光强度。我们的标本做好置 4-10 $^{\circ}$ C 保存 4 周,仍可阅片。我们应用单色和双色 FISH 法检测了正常人,二硫化碳,苯系物和丙烯腈接触工人精子的性染色体非整倍体率,按本方法制备的标本背景清晰,荧光强度高,杂交率达 99%。如何提高杂交效率,减少非特异性杂交是 FISH 技术的关键。