

λDNA体外重包装法进行化学诱变的初步研究^{*}

曹佳¹ 曹阳² 许丽苹³ 刘良式³ 侯永敏³ 卓鉴波¹

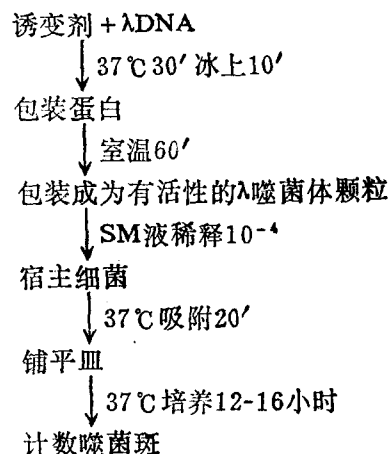
¹第三军医大学卫防系分子毒理室, 重庆 ²西南农业大学生物部遗传教研室, 重庆

³中山大学生物工程中心分子遗传室, 广州

λDNA 体外重包装技术, 是基因工程中的一个重要技术。该方法是先把带有目的基因的外源DNA片段插入到 DNA 载体上, 然后再与发生了突变的特殊噬菌体提供的噬菌体壳蛋白混合。即可在离体条件下装配成有感染活性的噬菌体颗粒, 以用于基因组文库的构建和外源基因表达的研究⁽³⁾。λDNA 体外重包装, 要求 λDNA 长度约在野生型 λDNA 的75-105% 之间。在此范围以外, 就不能包装成噬菌体颗粒。另外, λ噬菌体是迄今为止研究得最为详尽的噬菌体, 现在已经知道 λ噬菌体约有61个基因, 其中有一半参与了噬菌体的生命周期活动。如这些必要基因发生了突变, 也不可能形成噬菌斑⁽¹⁻³⁾。我们设想: 如果直接把 λDNA 在体外用诱变剂处理, 导致DNA链断裂, 或者导致参与噬菌体生命周期的必要基因(约占λ噬体总基因数的 1/2) 发生基因, 那么就可能造成 λDNA 包装效率下降, 形成噬菌体数目减少。这样以噬菌斑为观察指标, 通过与空白对照比较, 从理论上讲, 就有可能构建一种检测 DNA 断裂和基因突变的致突变物新方法。为此, 我们对构建新方法和检测化学受试物致突变性作了初步研究, 现将结果报道如下。

材料和方法

1. 实验流程



2. 需用菌株及其特性鉴定⁽¹⁾

2.1 菌株及其基因型:

2.1.1 大肠杆菌 E. coli BHB 2688, 基因型为: N205 recA⁻[rimm⁴³⁴, cIts⁻, b2, red⁻, Eam, Sam/r](提供噬菌体尾部蛋白)

2.1.2 大肠杆菌 E. coli BHB 2690, 基因型为: N205 recA⁻[rimm⁴³⁴, cIts⁻, b2, red⁻ Dam, Sam/r](提供噬菌体头部前体蛋白)

2.1.3 大肠杆菌 E. coli LE392, (宿主细菌)

2.2 基因型鉴定: 对 BHB2688 和 BHB2690 必须鉴定温度敏感性 (cIts⁻) 基因和修复突变 (recA⁻) 基因, 选取基因验证合格的单菌落制备包装蛋白抽提物。

3. 制备包装蛋白抽提物⁽¹⁾

按制备方案 I 制备。制备好的包装蛋白抽提物, 用离心管分装 (BHB2690 15μl/管, BHB2688 10μl/管) - 70°C 或液氮中保存备用。

4. 化学受试物及其剂量

* 国家自然科学基金资助课题

共用 8 种化学受试物进行实验：丝裂霉素 C (MMC, Sigma)、9- 氨基吡啶 (9-AA, Fluka)、甲基磺酸乙酯 (EMS, 上海试剂一厂)、长春新碱 (VCR, 上海制药五厂)、 HgCl_2 、 Na_3AsO_4 、NaCl 及蔗糖。均为化学纯。

每个化学受试物设 3-4 个剂量组, 3 个标准阳性诱变剂, 以及在 Ames 试验中 (平板掺入法) 阳性对照剂量为最高剂量。2 个具有诱变性的重金属化合物, 按其杀菌剂量 (1g/1L) 为最高剂量。长春新碱以其产生明显纺锤体毒性剂量为高限。所有化合物均用蒸馏水配制。

5. 诱变剂处理 λ DNA⁽⁴⁾

将 0.5 μg λ DNA 溶于 5 μl 的 10mM Tris, cl (pH7.9) 和 10mM MgCl_2 中, 加入 5 μl 化学受试物, 搅匀, 37 $^\circ\text{C}$ 温育 30 分钟, 置冰上 10 分钟终止反应。

6. λ DNA 体外重包装。

6.1 取出在深低温下保存的包装蛋白, 冰上融化, 先将融化的 BHB2688 转移至仍处于冰冻的 BHB2690 中。

6.2 当已合并的包装蛋白几乎全部融化时, 加入诱变剂处理过的 λ DNA 5 μl , 搅匀, 室温下保温 1 小时。

6.3 每管加入 1ml SM 液和 1 滴氯仿, 混匀, 并再做 10^{-2} 稀释。包装好的噬菌体液置 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱可长期保存。

6.4 每支试管加入 100 μl 宿主菌液 LE392, 对应加入稀释后的噬菌体液 10 μl , 混匀, 置 37 $^\circ\text{C}$, 吸附 20 分钟, 加上层琼脂约 3ml (47 $^\circ\text{C}$), 摇匀铺皿, 每个剂量组铺三个重复皿。

6.5 37 $^\circ\text{C}$ 倒置平皿培养 12-16 小时, 计数噬菌斑。

结果

1. 化学受试物的剂量反应关系

8 种化学受试物在 λ DNA 体外重包装法

中的剂量反应关系见图 1-5。其中 MMC、9-AA、EMS Na_3AsO_4 、 HgCl_2 是在预实验找到较明显的作用剂量范围后, 再按等差数列在其内设 3-5 个组。其余化合物的剂量反应关系, 是按 10 倍比稀释设组所得到的结果。

从图中可以看出, 3 个标准阳性诱变剂 (MMC、9-AA、EMS), 曲线并不是呈某种线性反应关系, 而是在某一剂量处, 当剂量再增大时, 噬菌斑数有一很陡的下降, 远远低于空白对照组。我们暂时将这一现象称之为“陡坎效应”。2 个重金属化合物也是如此。但作为阴性对照设置的 NaCl、蔗糖和蛋白毒剂长春新碱曲线则较平缓, 各剂量组噬菌斑数与空白对照组无显著差异。

2. 阳性结果判断标准

由于我们尚无法预先订出一个阳性结果的判断标准, 但本实验本质上是一个微生物实验, 与得到广泛应用的 Ames 试验基本相同, 故我们暂时参照 Ames 试验的阳性结果判断标准⁽⁶⁾, 制订以下阳性判断标准: 1) 平均每皿噬菌斑数比空白对照组减少一半 (即空白对照组为实验组的 2 倍)。2) 有重复性。3) 噬菌斑数随剂量增高而减少, 但并非一定是线性剂量反应曲线。4) 经统计处理有显著性差异。

按上述标准判断, 计有 MMC、9-AA、EMS、 HgCl_2 、 Na_2AsO_4 结果属阳性。其余化合物结果属阴性。具体检测结果见表 1。

讨论

1. 实验结果的初步分析

1.1 阴、阳性结果的吻合程度: EMS、MMC、9-AA 为标准阳性诱变剂, HgCl_2 和 Na_2AsO_4 在其它实验系统中已被证实具有致突变作用⁽⁷⁻¹⁰⁾。在本实验系统中, 这 5 种化学受试物均得到阳性结果。作为阴性对照设置的 NaCl, 蔗糖和纺锤蛋白毒剂长春新碱, 在本实验系统中均为阴性结果, 这亦与它们在其它实验系统结果一致。我们正在对更多

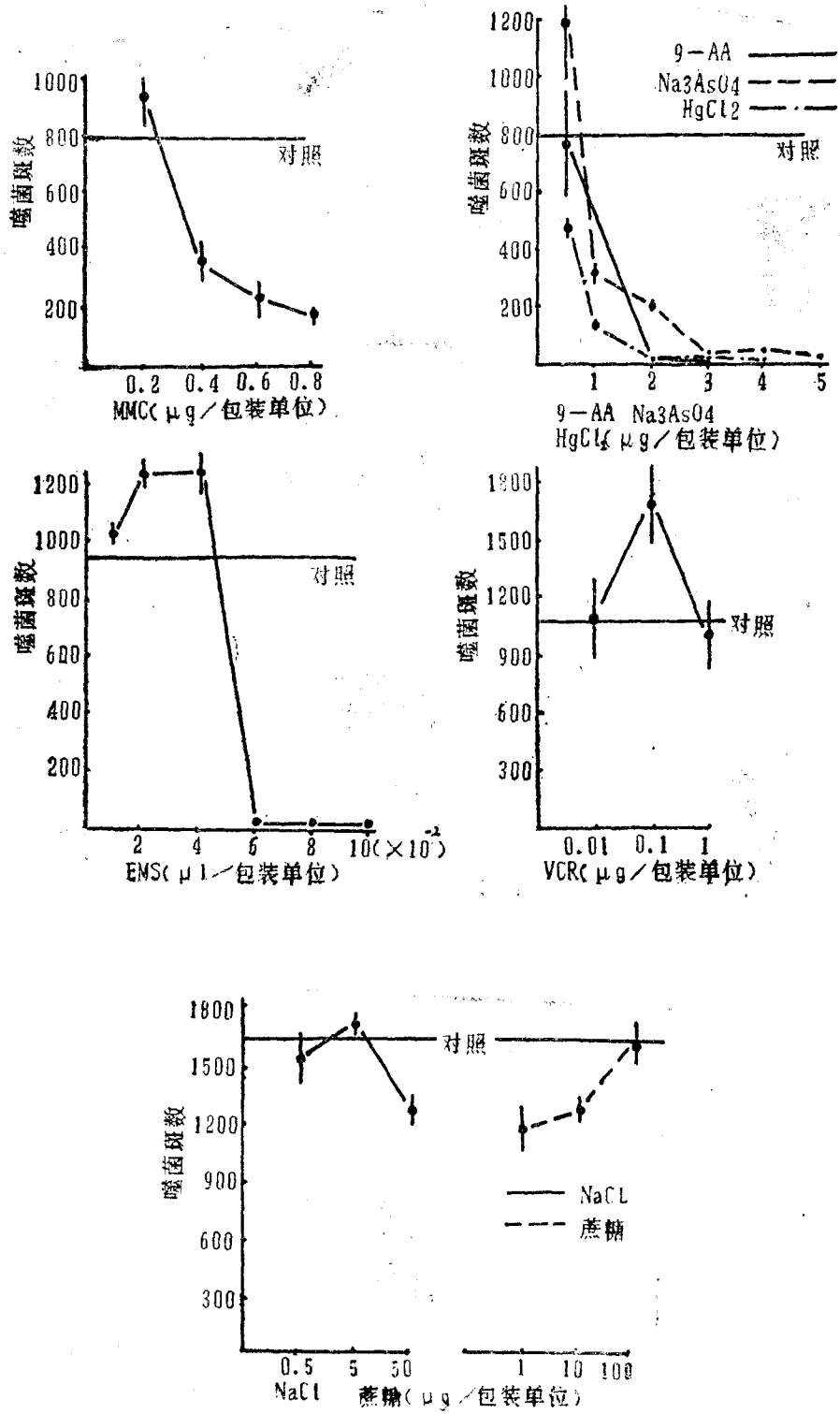


图 1-5 8种化学受试物的剂量反应曲线

表 1 8种化学受试物在 λ DNA重包装法中产生的噬菌斑数

化学物 名称	剂 量 ($\mu\text{g}/0.5\mu\text{g}\lambda\text{DNA}$)	噬菌斑数 $\bar{X} \pm \text{SD}$	化学物 名称	剂 量 ($\mu\text{g}/0.5\mu\text{g}\lambda\text{DNA}$)	噬菌斑数 $\bar{X} \pm \text{SD}$
MMC	0.8	197.7 \pm 19.8**	Na_3AsO_4	5	14 \pm 4.4**
	0.6	229.3 \pm 69.2**		4	44 \pm 3.0**
	0.4	365.7 \pm 57.7*		3	27 \pm 6.9**
	0.2	956.3 \pm 102.9		2	212 \pm 6.1**
	对照	799.0 \pm 72.3		1	314.3 \pm 37.3*
9-AA	5	无	0.5	1189.3 \pm 203.3	
	3	0.7 \pm 0.6**	对照	1087.3 \pm 65.3	
	2	6.3 \pm 2.3**	HgCl_2	4	7.7 \pm 2.5**
	0.5	769 \pm 193.8		3	13 \pm 5.2**
对照	799 \pm 72.3	2		5.3 \pm 0.9**	
EMS	0.1	17.0 \pm 4.4**	1	132.3 \pm 12.0**	
	0.08	15.7 \pm 3.2**	0.5	470 \pm 38.2*	
	0.06	15.0 \pm 2.7**	对照	1410.7 \pm 185.9	
	0.04	1240.0 \pm 69.3	NaCl	50	1261.3 \pm 74.3
	0.02	1239.0 \pm 46.2		5	1716.0 \pm 47.2
	0.01	1120.0 \pm 32.7		0.5	1529.3 \pm 186.8
	对照	946.7 \pm 140.5	对照	1653.3 \pm 122.2	
VCR	1	993.3 \pm 182.2	蔗糖	100	1594.7 \pm 165.6
	0.1	1674.7 \pm 218.4	10	1261. \pm 64.2	
	0.01	1094 \pm 215.9	1	1167.0 \pm 119.5	
	对照	1687.3 \pm 65.3	对照	1953.3 \pm 122.2	

*P<0.05

**P<0.01

注: **P<0.01, *P<0.05

的化学受试物进行实验, 以进一步判断该方法对致突变物检测的灵敏度、特异度和准确度。

1.2 检测的敏感程度

将新方法所能检测的诱变物阳性结果剂量与 Ames 实验中所用剂量比较, 可以发现新方法具有较高的灵敏度。新方法所检测的诱变物剂量, 比 Ames 试验缩小了 2.5-30 倍。这里必需指出的是, 新方法用于比较的是一个包装单位所用的剂量。一个包装单位完成包装后有 1ml 噬菌体原液, 铺一个皿仅需其中的 1/10000, 而用于比较的 Ames 实验的

剂量是指加在一个平皿内的。所以如果严格以一个皿内剂量作对比, 新方法所检测的最小剂量拟应再缩小 10000 倍。我们未这样做的原因, 是因为我们加样处理时尚不能做到这样小的剂量。

2. 新方法初步显示的特点

初步构建的 λ DNA 体外重包装法用于致变物的检测, 已显示出以下几个明显的特征或优势。

2.1 诱变剂直接处理裸露 DNA: 这是本实验方法的最显著特征。它使 DNA 损伤更为直接, 也不需用较高剂量来穿透细胞屏障,

部份化合物也不会因代谢转化而灭活。但是,随之可能产生另外一个问题,即DNA出现的损害,不一定是化合物真正的诱变性造成的,而可能是化合物的物理化学特性对DNA直接的损害(如强酸强硷,有机溶剂等),也就是说在其它实验系统中,这些化合物不会出现DNA的损害。所以,在我们的这一方法中如何区分真正的诱变和假阳性,是一个值得认真研究的问题。

2.2 便于进一步进行分子突变机理的研究。由于直接用诱变剂处理 λ DNA,处理后的 λ DNA除一部分用于包装噬菌体颗粒外,另一部分可直接用于分子突变机理研究。我们对诱变剂处理后的 λ DNA进行酶切,然后进行琼脂糖电泳,已初步判定了几种具有DNA断裂作用和交联作用的诱变剂(详见曹阳等文,待发表)。当然,突变基因的定性和定位难度都较大,需采用DNA探针技术,分子杂交技术,DNA序列分析技术等。但新方法与其它方法相比,无疑省掉了提取和纯化DNA的步骤,可大大地节省人力和时间。

2.3 具有经济、简便、快速的特点,适合做为快速初筛实验。

新方法虽是基因工程中的一个重要技术手段,但从本质上讲全套操作仍是一个微生物实验,无需特殊的技术和试剂。我们对 λ DNA体外重包装实验的费用进行了初步估算,所需费用比Ames实验为低,或最多相当。

本实验还有一个很大的优点,就是实验不必一气可成,而可以独立地分为三个阶段进行。这就是包装蛋白抽提物的制备、 λ DNA体外重包装和噬菌颗粒铺皿。1)制备好的包装蛋白抽提物,贮存于 -70°C 或液氮中可长期保存,其包装效率不会明显下降。这就可以较从容地制备好一批包装蛋白后,择时进行 λ DNA体外包装反应。同时,包装蛋白也可以商品化,由有条件的实验室制备,基层和条件尚不具备的实验室,可以购买包装

蛋白而开展实验。2) λ DNA一旦被包装成噬菌体颗粒,用噬菌体SM保存液稀释后,可在 4°C 冰箱中保存1年左右,而成活率不会明显降低。所以,包装好的噬菌体颗粒可以立即铺皿,也可以几天,几周或几月后铺皿。同时,由于一个剂量的一次包装反应,可得噬菌体原液 1ml ,而铺一个皿,仅需其中的 $1/10000$,故有大量的噬菌体原液或稀释液可供重复铺皿或以后重复验证。

λ DNA体外重包装实验周期短,从体外包装到噬菌斑的观察计数,全过程仅需16-20小时。比Ames实验省时1天以上。便于大批样本的筛选和满足时间上的急需。

3. 问题

3.1 组间差异问题:从实验的初步结果看,新方法总的来说是稳定的,但结果仍有一定的组间差异,即每批包装反应间包装效率有一定波动。如每批包装反应中作为阴性对照的蒸馏水组,噬菌斑数在800-1200左右居多,但最高时个别可达1600左右。原因可能是由于 λ DNA体外重包装是一个精细的过程,影响因素较多,每次包装反应的操作也很难做到完全一致,这也是我们每批包装反应均设对照的原因。但同一剂量组内各平行皿间噬菌斑数波动却较小,反映在除个别剂量组外,大部份实验组标准差并不大。我们正在对实验影响因素逐一探讨,并将实验操作尽量严格和规范,以减少标准误和标准差。

3.2 一些低剂量组噬菌斑数高于空白对照组:从图1-5及表1可以看出,MMC、EMS、 Na_3AsO_4 及长春新碱均出现这一现象。提示这一现象可能不是操作误差或实验结果的偶然波动造成的,而可能是客观存在的一种现象。似乎低剂量化学受试物存在时,反而可以促进包装效率的提高。这无疑是一个值得探讨的问题。

参 考 文 献

1. T. 曼尼阿蒂斯, 等著。分子克隆操作指南。第一版。北京: 科学出版社, 1986; 166-173
2. R. W. 戴维斯, 著。高级细菌遗传学——遗传工程手册。第一版。天津: 天津科学技术出版社, 1984; 110-112
3. 吴乃虎, 著。基因工程原理。第一版。北京: 高等教育出版社, 1989; 146-170
4. Povirk LF. Bleomycin-induced mutagenesis in repackaged lambda phage. *Mut Res* 1987; 180: 1-9
5. Benchimol Sam, et al Bacteriophage λ DNA Packaging in vitro. *J Biol Chem*. 1982; 257(9): 5201-5210
6. 黄幸纾, 等编著。环境化学致突变、致畸、致癌试验方法。第一版。杭州: 浙江科技出版社, 1985; 13-39
7. 姚佩佩, 等译: 砷的环境卫生标准。第一版。北京: 人民卫生出版社, 1985; 141-143
8. 施荣山译: 砷的致癌、致畸和致突变性。国外医学(卫生学分册)。1981; 5: 264-266
9. 何断亮, 译: 汞化合物的诱变作用和致畸作用。国外医学(卫生学分册)。1984; 2: 51-93
10. 印木泉, 等: 饮水卫生标准限量的汞对蚕豆根尖细胞的微核效应。第二军医大学学报。1990, 11(3): 222-224

(上接第56页)

- properties. *Adv Pharmacol Chemother* 1975; 12: 291.
32. Solomon SJ, et al. Modified nucleoside in asbestos workers at high risk of malignant disease: result of a preliminary study applying discriminant analysis. *Br J Ind Men* 1986; 42(8): 560.
 33. Schwartz DA, et al. Monocyte-derived growth factor in asbestos induced interstitial fibrosis. *Environ Res* 1989; 49(2): 283.
 34. Bauman MD, et al. Secretion of platelet-derived growth factor homologue by rat alveolar macrophages exposed to particulates in vitro. *Eur J Cell Biol* 1990; 51(2): 327.
 35. Lechner JF, et al. Differential responses to growth factor by normal human mesothelial cultures from individual donors. *J Cell physiol* 1983; 139(2): 295.

(上接第74页)

4. Tennant RW, et al. Comparative evaluation of genetic toxicity pattern of carcinogens and noncarcinogens: Strategies for predictive use of short term assays. *Environ. Health persp* 1987; 75: 87-95
5. Brockman HE, et al. Utility of short-term tests for genetic toxicity in the aftermath of the NTP's analysis of 73 chemicals. *Environ Mol Mut* 1988; 11: 421-435.
6. Zeiger E. Strategies for the identification of rodent carcinogens by in vitro short term tests. In "Mutation and the Environment" Part D, Mendelson ML & Albertini RJ Ed. NY, Wiley-Liss, 1990; 261-271
7. Zeiger E, et al. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ Mol Mut* 1990; 16(Suppl 18): 1-14.