

褶合光谱法考察亚硝酸钠致 DNA 突变的初步研究

陆 峰^{1*}, 张 宁², 曹永兵¹, 吴玉田¹

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 解放军 224 医院药剂科, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要: 目的 采用褶合光谱法考察亚硝酸钠致 DNA 突变。方法 选择检测波长在 200 ~ 340 nm, 以同一浓度的 DNA 多次扫描组成自身标准, 并考察了此浓度的 DNA 溶液在亚硝酸钠作用下的光谱变化。结果 小牛胸腺 DNA 与亚硝酸钠作用后, 其差谱值在 200 ~ 340 nm 随着时间的延长不断增大, 且与亚硝酸钠浓度呈正相关, 与近红外光谱的检测结果一致。结论 褶合光谱法检测 DNA 突变过程简便快捷、成本低廉、灵敏度高, 有望用于新药致突性的高通量检测。

关键词: DNA 突变; 亚硝酸钠; 褶合光谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)06-0447-03

药物的毒性检测和安全性评价是新药研究开发的重要内容, 其中致突变实验是新药申报临床研究的重要前提。目前, 常规的致突变检测方法包括: 沙门氏菌 Ames 实验、哺乳动物细菌正向突变实验等。近年来又建立了许多新的方法^[1], 如穿梭质粒载体、转基因动物致突变测试系统等。但这些试验方法均较复杂、实验周期长、成本高, 较难实现从庞大的化合物样品库中快速地筛选致突变剂。

本文采用褶合光谱法^[2,3]检测 DNA 突变, 并以三维差谱作为 DNA 是否突变的定性指标以及突变程度的定量指标。该法具有简便快速(全过程小于 1 min)、不消耗探针或引物等昂贵试剂、紫外光谱仪器通用性良好、样品无需前处理等优点。本实验在前期考察紫外线诱导 DNA 突变^[4,5]的基础上, 选用公认的 DNA 交联/氧化剂亚硝酸钠为致突变剂, 考察亚硝酸钠的致突变作用及其在褶合光谱上的变化规律。

材 料 与 方 法

仪器与试剂 Varian Cary 100 紫外可见分光光度仪, Bruker Vector 22/N 近红外光谱仪, 褶合光谱分析系统。小牛胸腺 DNA(ctDNA) 购自华美生物试剂有限公司; Tris 盐为酶级(US Biochemical Co.); EDTA

二钠盐和 NaCl, HCl, NaOH, NaNO₂ 等试剂均为 AR 级。

溶液的配制 取小牛胸腺 DNA 适量, 用 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液配制成适当浓度的 DNA 溶液, 使其最大吸收度约为 0.6。分别于使用前配制 0.5, 0.05 和 0.005 μg·mL⁻¹ NaNO₂ 水溶液。

溶液的褶合光谱法考察 以 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液为空白, 采集 DNA 溶液的紫外光谱, 波长 200 ~ 340 nm, 间隔 1 nm。初始重复测定 7 次, 作为自身标准(ego criteria)。之后每隔 5, 15, 30, 60 和 120 min 扫描, 各重复 3 次, 作为样品。通过褶合光谱分析系统两两匹配, 得出相应的三维褶合差谱值。同法分别测定 DNA 溶液中按 1:1 加入 50 μL 蒸馏水、生理盐水、各浓度的亚硝酸钠溶液等的差谱值。

近红外光谱法考察 取考察了紫外光谱的 DNA 溶液、DNA-生理盐水溶液、DNA-NaNO₂ 溶液, 以 Tris-HCl 缓冲液为背景, 采集其近红外透射光谱, 波数 8 000 ~ 4 000 cm⁻¹, 分辨率 8 cm⁻¹, 光程 2 mm。

结 果 与 讨 论

1 褶合光谱优化条件的选择

前期实验^[4,5]均以高、中、低 3 种浓度的 DNA 溶液多次扫描得到的光谱作为褶合变换的标准光谱。本实验发现, 随着 DNA 的逐步稀释, 其紫外吸收光谱在 240 nm 附近有明显的交叉(紫外吸收光谱图略)。这可能是由于大分子化合物在溶液中有一定

收稿日期: 2001-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100233).

作者简介: 陆 峰(1971-), 男, 博士, 讲师.

* Tel: (021) 25070350, E-mail: lookingll@etang.com

的伸展程度和空间取向^[6],并随着浓度变化而变化,从而影响了折射系数,反映为 UV 光谱的曲率变化。因此,本实验选择了同一浓度的 DNA 多次扫描组成自身标准,并考察此浓度的溶液在潜在突变剂作用下的光谱变化。

小牛胸腺 DNA 分别在 210 和 258 nm 处有两个吸收峰, Mach 等^[7]在研究 DNA 光谱中的杂质时选取了 240 ~ 300 nm。通过比较发现,240 ~ 300 nm 波段处的差谱值(δ)的变化幅度较 200 ~ 340 nm 的 δ 小,且没有明显的规律。可能的原因是:反映 DNA 变化的光谱区域主要集中在 210 nm 附近,因此本实验选择 200 ~ 340 nm 的整条吸收曲线作为考察差谱值的区域。图 1 为 DNA 和 DNA-0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaNO_2 (作用 120 min 后)溶液的紫外吸收光谱,由图可见,两者的差异是微乎其微的,很难识别。

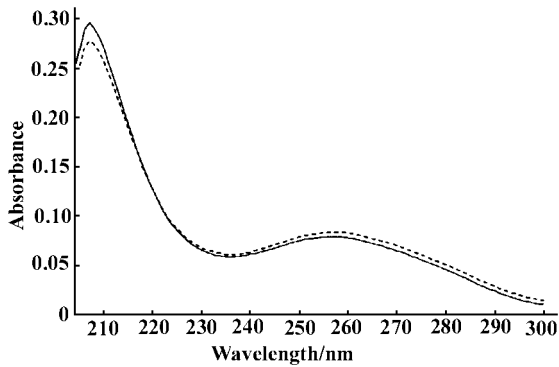


Figure 1 UV absorption spectra of DNA (—) solution and mixture of DNA-0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaNO_2 (---, 120 min after mixing)

2 空白与阴性实验

考察小牛胸腺 DNA 溶液(空白对照)在光谱仪中随时间变化的光谱图,并以加入适量蒸馏水、生理盐水的 DNA 溶液为阴性对照,其差谱值变化见图 2。所得的差谱值很小且存在轻微波动,可认为是仪器噪音的影响。因此可以判定,小牛胸腺 DNA 在 Tris 缓冲液中稳定,在水、生理盐水中不会发生变化,符合正常放置状态及生理状态的情况。空白与阴性实验的结果为阳性实验结果(差谱值有规律地升高)提供了判断依据:DNA 本身稳定,以下所测得的光谱变化是因为加入的化合物引起了 DNA 变化。

3 小牛胸腺 DNA 与亚硝酸钠作用后 δ 的变化

已有研究证实,亚硝酸钠的主要作用是使 DNA 分子上一条链的碱基与互补链上的相应碱基共价连接,形成 DNA-DNA 交联。此外,亚硝酸钠还可引起碱基的氧化脱氨反应,使氨基变为酮基,造成碱基转

换的突变。图 3 为亚硝酸钠与小牛胸腺 DNA 作用后,差谱值随着时间的延长不断增大,且与亚硝酸钠浓度呈正相关关系。

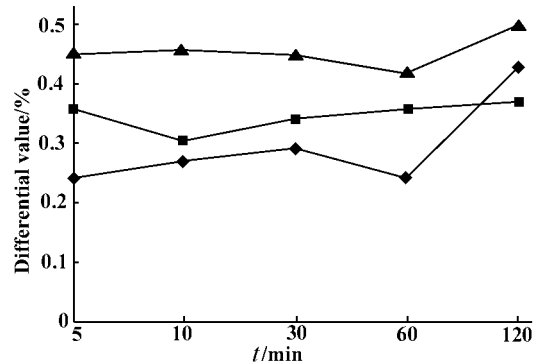


Figure 2 Differential values of calf thymus DNA (\diamond — \diamond) with addition of distilled water (\triangle — \triangle) and normal saline (\square — \square)

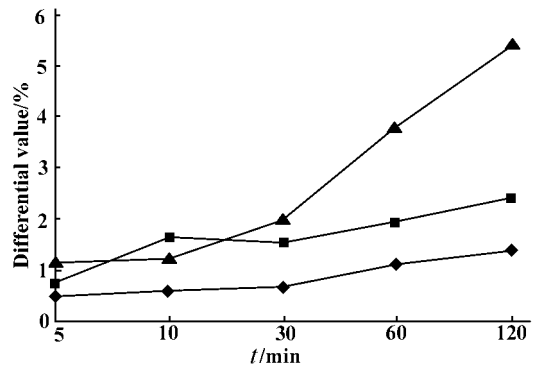


Figure 3 Differential values of calf thymus DNA reacted with 0.5 (\triangle — \triangle), 0.05 (\square — \square) and 0.005 (\diamond — \diamond) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ sodium nitrite

实验中还出现了一个现象:将上述经高、中、低浓度的亚硝酸钠处理后的小牛胸腺 DNA 溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)测定其吸收光谱,溶液的褶合光谱差谱值由 120 min 处的 1.37%、2.41% 和 5.44% 分别降至 0.51%、0.40% 和 0.53%,即相当于 DNA 未发生变化前的水平,是何原因导致差谱值降低,有待进一步研究。

4 紫外-褶合光谱法与近红外光谱法结果的初步比较

前期研究曾采用毛细管电泳^[5]验证 DNA 的变化。由于紫外光谱反映的仅是 DNA 共轭基团(嘌呤、嘧啶)的信息,而近红外光谱还反映含氢基团的信息,因此理论上可以从侧面间接地验证紫外光谱-褶合变换得到的差谱信息的可信度。图 4 为小牛胸腺 DNA 以及添加 0.005 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaNO_2 后的近红外

(NIR) 透射光谱图。

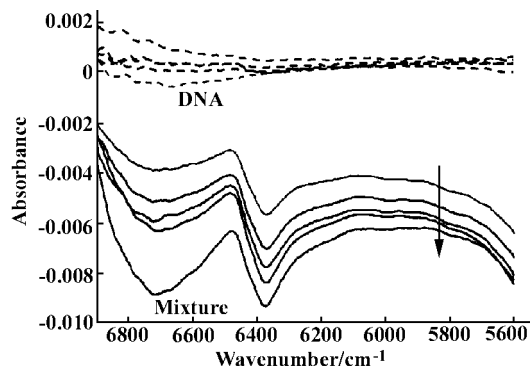


Figure 4 Near infrared spectra of calf thymus DNA and its mixture with sodium nitrite. — Spectra of DNA; — Spectra of mixture. The arrow indicates the time-dependent variation of the spectra, from 10 ~ 120 min

图中 DNA 溶液的 NIR 光谱(—) 稳定性良好, 而加入 NaNO_2 后的光谱(—) 发生明显变化, 且随时间变化加剧, 这与紫外-褶合光谱的差谱值是基本一致的。

尽管褶合光谱法无法提供 DNA 突变机理方面的信息, 但它可以定性地给出 DNA 是否突变及变化的程度, 尤其是在变化程度极微时即可灵敏地检测, 这已足以考察某些化合物是否具有致 DNA 突变的作用。褶合光谱法从采集光谱到给出 δ 值的过程在 1 min 内完成, 配合多比色池、二极管阵列检测等设

备, 可能同时完成十几批甚至几十批样品的测定工作, 简单快速。本实验应用褶合光谱法成功地检测了 NaNO_2 对小牛胸腺 DNA 的致突变作用, 从而为褶合光谱法应用于致突药物高通量检测提供了可能。

REFERENCES:

- [1] Yin MQ, Yu YN, Zheng YW. Retrospective review of the development of genetic toxicology in China [J]. *J Health Toxicol* (卫生毒理学杂志), 1999, 13(4): 229 - 233.
- [2] Wu YT. Theory and application of convolution curve spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(Suppl): 20 - 24.
- [3] Zheng H, Fang HS, Wu YT. Identification of impurities in DNA sample by using the convolution spectrum method [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(11): 847 - 849.
- [4] Lu F, Liu LL, Wu YT. A fast determination of DNA mutation induced by ultraviolet radiation [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10(2): 97 - 100.
- [5] Lu F, Zhang XF, Liu LL, et al. Screening of anti-mutation medicine by convolution spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29(11): 1325 - 1328.
- [6] Liu J, Luo GA, Wang YM, et al. Research development of the interaction of small molecules with nucleic acids [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(1): 74 - 78.
- [7] Mach H, Middaugh CR, Lewis RV. Detection of proteins and phenol in DNA samples with second derivative adsorption spectroscopy [J]. *Anal Biochem*, 1992, 200(1): 20 - 26.

STUDIES ON NaNO_2 -INDUCED DNA MUTATION BY CONVOLUTION SPECTROMETRY

LU Feng¹, ZHANG Ning², CAO Yong-bing¹, WU Yir-tian¹

(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;
2. Department of Pharmaceutical Preparations, 224 Hospital of PLA, Jianshi 154007, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the sodium nitrite induced DNA mutation by convolution spectrometry (CS). **METHODS** The spectra of sodium nitrite-induced mutative calf thymus DNA was compared with ego criteria based on Spectra of the primary DNA within the wavelength range from 200 to 340 nm. Distilled water served as blank and normal saline served as negative control. Any difference was quantitatively expressed by differential value (δ) of convolution spectra. Near-infrared spectroscopy was employed as the reference method. **RESULTS** The differential value was positively correlated with the increasing time and concentration of sodium nitrite. δ values increased to 1.37%, 2.41% and 5.44% respectively within 2-hour's reaction between calf thymus DNA and 0.5, 0.05 and 0.005 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ sodium nitrite, while on the contrary, changes could be hardly observed on the corresponding UV absorption spectra. The results were also confirmed by their corresponding near-infrared spectra. **CONCLUSION** The δ values can be used to represent the compound's strength of mutagenesis. Every convolution procedure takes less than one minute, so CS provides a fast, simple and inexpensive alternative method to determine chemical or medicinal DNA mutation.

KEY WORDS: DNA mutation; sodium nitrite; convolution spectrometry