

超声诱导对家蝇幼虫基因组 DNA 影响的谱学研究

安春菊¹, 李 锋², 张立金², 李德森¹, 杜荣骞^{1*}

1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071

2. 中国农业大学应用化学系, 北京 100094

摘 要 超声诱导 3 日龄家蝇幼虫后提取对照和处理组的基因组 DNA, 利用紫外光谱、荧光光谱、红外光谱、核磁共振谱对其结构进行分析, 并利用 PCR 对基因组中 attacin 基因的 3' 端序列进行测序比较。结果表明, 超声诱导能够影响家蝇幼虫基因组 DNA 的二级结构和碱基堆积状态, 进而在 DNA 复制时造成碱基错配最终导致 DNA 序列发生改变, 但是超声诱导对 DNA 的化学基团和化学键没有明显的影响。

主题词 家蝇幼虫基因组 DNA; 超声诱导; DNA 二级结构

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)12-2020-04

引 言

DNA 是生物体内的遗传信息载体之一, 与生物的生长、发育等正常生命活动以及癌变、突变等异常生命活动有关。因此研究 DNA 结构与功能的关系, 将有助于人们从分子水平了解生命现象的本质。目前, 已有大量文献^[1-3]报道 DNA 在生物体外受到诱导后其结构的变化情况, 但关于生物体本身被诱导后其 DNA 结构变化情况的报道尚属空白。本文利用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、红外光谱、核磁共振等手段研究了家蝇幼虫经超声诱导后其基因组 DNA 的结构变化情况, 并考察了家蝇幼虫体内 Attacin 基因的 3' 端碱基序列变异情况。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

家蝇 (*Musca domestica*) 由本实验室饲养, 饲养温度 25~30 °C, 相对湿度 50%~70%; 十六烷基三甲基乙基溴化铵 (CTAB)、三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)、Na-EDTA 均购自上海生工生物工程技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

UV-Vis-NIR 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); Shimadzu IR-435 红外光谱仪 (日本 Shimadzu 公司); F-4500 荧光光谱仪 (Hitachi 公司); Bruker DPX-300 MHz 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 家蝇基因组 DNA 的提取

家蝇幼虫饲养至 3 日龄时, 用 45 kHz 50 W 超声处理

1 min。诱导后于干净饲料中继续饲养 6 h 后收集, 按文献 [4] 提取家蝇幼虫基因组 DNA, 记为 U。同时提取未加诱导的家蝇幼虫的基因组 DNA, 记为 CK。所得 DNA 经 UV 谱检验, $A_{260}/A_{280} > 1.9$, 表明纯度符合要求。

1.2.2 紫外吸收光谱实验

将 1.2.1 所得的 DNA 用双蒸水适当稀释后, 于 1 cm 石英比色池中测定紫外吸收光谱, 波长范围为 200~320 nm。

1.2.3 荧光光谱实验

在 F-4500 荧光光谱仪上进行, 样品池为 1 cm 石英池, 用溴化乙锭 (EB) 为荧光探针测其荧光光谱 ($\lambda_{ex} = 400$ nm, $\lambda_{em} = 800$ nm)。

1.2.4 红外光谱实验

采用溴化钾压片法测定。

1.2.5 核磁共振 (NMR) 实验

所用溶剂为 D_2O , 内标为 TMS。

1.2.6 超声对 attacin 基因 3' 端碱基序列的影响

按照 Genbank 上 attacin 基因的 cDNA 序列 (GenBank 注册号: AY460106) 设计上游引物 5'-NH₂-GGCAAACGAA-CAAACATA-3' 和下游引物 5'-NH₂-TACTTG-GCAAAATCTTAG-3', 分别以 CK 和 U 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94 °C, 7 min → 94 °C 45 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环 → 72 °C, 10 min。PCR 产物纯化后克隆测序。

2 结果与分析

2.1 超声诱导对家蝇幼虫基因组 DNA 影响的紫外吸收光谱研究

DNA 分子中由于含有芳香性碱基 (嘌呤和嘧啶) 及磷酸

收稿日期: 2004-05-26, 修订日期: 2004-10-12

基金项目: 天津市自然科学基金 (03360491) 资助项目

作者简介: 安春菊, 女, 1977 年生, 南开大学生命科学学院博士研究生

* 通讯联系人

生色基团,使得其在近紫外区得到强的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁,在 260 nm 左右表现出一强吸收峰。当 DNA 分子轴向收缩,构象发生变化时会产生减色效应,当 DNA 分子的双螺旋结构被破坏时则会产生增色效应^[5]。增色效应和减色效应是 DNA 特有的与其双螺旋结构密切相关的光谱性质,故通过测定 DNA 的紫外吸收光谱可对其二级结构的变化情况作出初步判断。家蝇幼虫经超声诱导后其 DNA 的紫外吸收光谱如图 1 所示,可以看出超声诱导后其最大吸收峰由 260 nm 变为 264 nm,红移了 4 nm。且在热变性过程中,CK 和 U 的 $\Delta A_{280 \text{ nm}} / \Delta A_{260 \text{ nm}}$ ($\Delta A = A_{95 \text{ }^\circ\text{C}} - A_{25 \text{ }^\circ\text{C}}$) 比值也不同,分别为 1.32 和 1.07,表明超声诱导可能影响了家蝇幼虫基因组 DNA 的碱基堆积状态和螺旋度。

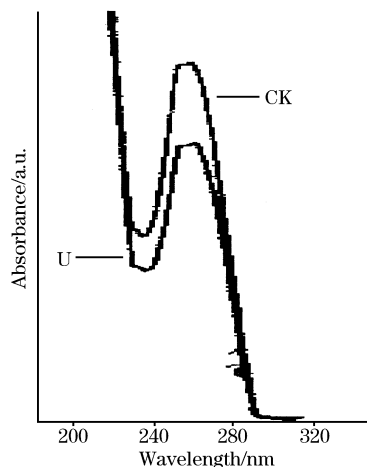


Fig. 1 The UV absorption spectra of CK and U

2.2 超声诱导对家蝇幼虫基因组 DNA 影响的荧光光谱研究

溴化乙锭(EB)是一种具有平面分子结构的能与 DNA 双链发生专一插入作用的荧光染料,它能嵌入到 DNA 双链的碱基对之间导致荧光强度大大增强,故成为测定 DNA 结构及各种性质的灵敏试剂^[6]。当用 EB 作探针研究超声诱导后家蝇幼虫基因组 DNA 的荧光光谱变化情况时,发现与对照相比,其荧光发射峰的峰形及峰位均未有变化,但是其激发峰则由 511 nm 蓝移到 504 nm,且荧光强度降低了约 50%(见图 2)。这些结果表明超声诱导导致家蝇幼虫的 DNA 与 EB 的亲合力较相应对照组低,可能的原因是家蝇幼虫经

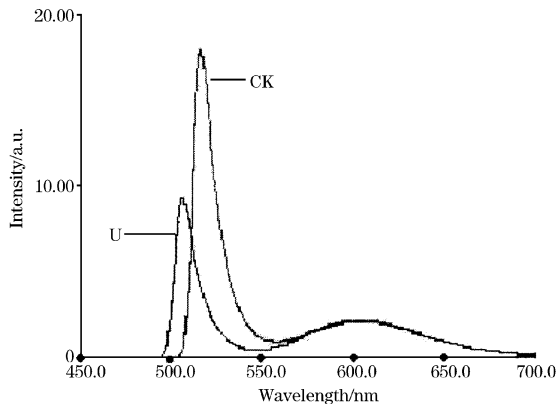


Fig. 2 The fluorescence spectra of CK and U

超声处理时 DNA 受到损伤,二级结构被破坏,使 EB 嵌入量减少,荧光量子产率下降。

2.3 超声诱导对家蝇幼虫基因组 DNA 影响的红外光谱研究

由 DNA 的结构可知, DNA 的红外光谱发色团主要包括碱基中的 C—H, N—H, C=O, C—C, C—N, 脱氧核糖的 C=O, O—H 和磷酸骨架基团。对所得 DNA 的红外光谱进行谱峰归属得到: $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 为 N—H 的伸缩振动、 $1\ 650 \sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 为 C—N, C—C 的伸缩振动或 N—H 的面内弯曲振动、 $1\ 400 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 为芳环 H 的面外弯曲振动或磷酸二酯基团的非对称伸缩振动、 $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 为 C—H 的伸缩振动或磷酸二酯基团的对称伸缩振动^[7]。由图 3 可以看出 CK 与 U 的红外光谱的谱峰位置和相对强度基本相同,差异很小。说明超声诱导可以破坏基因组的二级结构,但对 DNA 中的化学基团和化学键没有明显的影响。

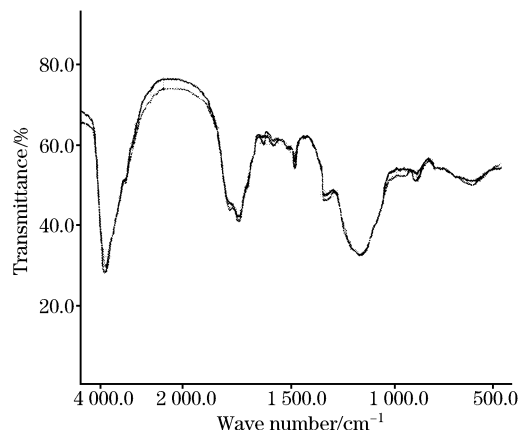


Fig. 3 The infrared spectra of CK and U

2.4 超声诱导对家蝇幼虫基因组 DNA 影响的 ¹H NMR 谱研究

图 4 是 CK 与 U 的一维核磁谱图,根据质子的类型对共

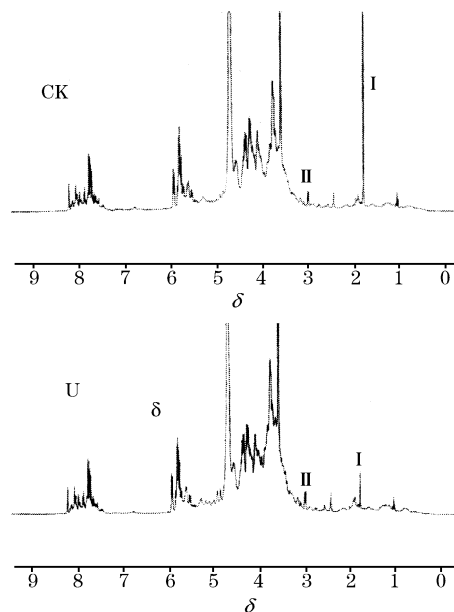


Fig. 4 ¹H NMR spectra of CK and U

振峰进行分类: 7.5~8.5, 5.5~6.0, 2.0~5.0 和 1.8 ppm 分别是芳香碱基质子、胞嘧啶质子、脱氧核糖质子和胸腺嘧啶甲基质子(峰 I)的化学位移。从图 4 可以看出, 除峰 I 外, 其余质子共振峰的化学位移和峰积分面积大致相同。已知所有脱氧核酸苷在 2.3~2.7 处均有一个由脱氧核糖环上 C² 的亚甲基质子 H² 引起的双重峰(峰 II)^[8], 选择此峰作为参照峰。因为¹H NMR 谱中每个峰的覆盖面积代表了某个对应基团的质子数目, 故以双峰比(峰 I 积分面积/峰 II 积分面积)来表示峰 I 质子的相对含量。结果表明, CK 与 U 中双峰比分别为 3.39 和 0.87, 差异非常显著。

H 质子周围由于电磁感应现象, 使电子产生运动, 抵消了一部分外磁场 H_0 , 因而使 H 质子受到的有效磁场为 $H_{\text{有效}} = H_0 - H_0\sigma = H_0(1-\sigma)$ (σ 为屏蔽常数, $H_0\sigma$ 为 H 质子周围电子运动所产生的感应磁场)。正常情况下, DNA 分子中胸腺嘧啶甲基质子所受到的有效磁场是稳定的, 在¹H NMR 谱

上形成的共振吸收峰也相对稳定, 但当家蝇幼虫受超声诱导后, 细胞内环境必然会发生一定程度的改变, 势必引起 DNA 分子中胸腺嘧啶甲基质子周围的磁环境发生改变, 相应的引起 $H_0\sigma$ 的改变, 产生反磁屏蔽作用, 使 $H_{\text{有效}}$ 改变, 导致部分甲基质子向邻区发生位移, 造成双峰比下降。

2.5 超声对家蝇幼虫 Attacin 基因 3'端碱基序列的影响

PCR 扩增后测序结果表明超声诱导后, 该基因的部分碱基序列发生了改变(如图 5 中黑体字所示)。其原因可能是超声诱导导致 DNA 二级结构和碱基堆积状态发生了改变, 在 DNA 复制过程中, 有些碱基配对时不符合经典的 Watson-Crick 碱基配对规律(即 A-T, G-C), 出现了错配现象, 并且这些错配的碱基没有被及时地修复, 在进一步的复制中被保留下来, 最终影响到基因的碱基序列。这也与文献[9]关于 DNA 构象若发生变化则稳定性会降低进而影响其在体内的复制和表达的报道一致。

```
CK CAAACGAACAAACATATAGGCGTTGGTTTAAGTCATGATTTTAAATTTTAGGAGCTGAAGATGTC
U  CAAACGAACAAACATATAGGCGTTGGTTTAAGTCATGATTTTAAATTTTAGGAGATAAAGATGTC
CK ATTCATTTATGAAAAGATAATATTTGTTCTACTGAGTAAAAATAAATTCTAAGATTTTGCCAAGTA
U  ATTCATTTATGAAAAGTTAATATTTATTCTATTGAGTAAAAATAAATTCTAAGATTTTGCCAAGTA
```

Fig. 5 The sequence of 3'-end of attacin in housefly larvae

3 结 论

综上所述, 从紫外-可见光谱, 荧光光谱, 红外光谱, 核磁共振及 PCR 实验结果来看, 超声诱导家蝇 3 日龄幼虫后, 其基因组 DNA 的二级结构和碱基堆积状态发生改变, 进而影响 DNA 在体内的复制, 但是超声诱导对 DNA 的化学基

团和化学键没有明显的影响。

生物大分子是结构与功能的统一, 结构的改变将影响其功能的实现。超声诱导对家蝇幼虫基因组 DNA 构象的影响可能是其发挥作用的分子生物学基础之一。深入研究超声诱导对生物体基因组 DNA 的影响机制对更好地了解某些生理现象、人类的遗传变异、癌症等重大疾病具有重要理论意义和应用价值。

参 考 文 献

- [1] YU Duo-wei, KE Wei-zhong(余多慰, 柯惟中). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(3): 311.
- [2] LI Lai-sheng, HUANG Wei-dong, YAN Yuan(李来生, 黄伟东, 鄢 远). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(5): 685.
- [3] KE Wei-zhong, YU Duo-wei, GU Bai-ping, ZHUANG Zhen-wu(柯惟中, 余多慰, 顾柏平, 庄振武). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 790.
- [4] Kim W K, Mauthe W, Hausner G, et al. Can. J. Bot., 1990, 68: 1898.
- [5] SHEN Tong, WANG Jing-yan(沈 同, 王镜岩). Biochemistry(生物化学). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 1990. 347.
- [6] YE Yong, HU Ji-ming, ZENG Yun-e(叶 勇, 胡继明, 曾云鄂). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(5): 623.
- [7] WANG Yan-ji, SONG Zeng-fu(王彦吉, 宋增福). Spectral and Chromatographic Analyses(光谱分析与色谱分析). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 1995. 86.
- [8] CHEN Li-qi, QU Han-ting, TAO Hai-yan(陈立奇, 屈汉廷, 陶海燕). Journal of Beijing Medical University(北京医科大学学报), 1995, 27(3): 177.
- [9] SUN Nai-en, SUN Dong-xu, ZHU De-xu(孙乃恩, 孙东旭, 朱德煦). Molecular Genetics(分子遗传学). Nanjing: Nanjing University Press(南京: 南京大学出版社), 1996. 1.

Effects of Ultrasound Induction on Genomic DNA of Housefly Larvae

AN Chun-ju¹, LI Feng², ZHANG Li-jin², LI De-sen¹, DU Rong-qian^{1*}

1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract The genomic DNA of housefly larvae was extracted after ultrasound induction, and the structure was analyzed by UV, fluorescence, IR and ¹H NMR. The 3'-end of attacin gene was sequenced and compared by means of PCR. All the results indicated that ultrasound induction can destroy the second structure and the base stacking of genomic DNA of housefly larvae, which will result in mismatch repair during DNA duplication and finally change the sequence of DNA, but it has no significant effect on chemical groups and chemical band of genomic DNA.

Keywords Genomic DNA of housefly larvae; Ultrasound induction; DNA structure

(Received May 26, 2004; accepted Oct. 12, 2004)

* Corresponding author

第十四届全国分子光谱学学术会议(第一论通知)

会议简介

“第十四届全国分子光谱学学术会议”由中国化学学会物理化学委员会和中国光学会光谱委员会联合主办、吉林大学超分子结构与材料教育部重点实验室承办,定于2006年7月8~11日在长春召开。届时,会议将就分子光谱基础研究和应用技术等进行广泛的学术交流,同时将邀请国内外知名学者对有关学术领域的热点问题做报告,会议将组织各类专题讨论和学术交流。

本次会议是我国分子光谱界的又一次聚会和高水平、高信息容量的学术交流。竭诚欢迎全国高等院校、科研机构 and 产业部门从事分子光谱研究和应用开发的同事和朋友们来吉林大学参加会议,交流最新研究成果,推进分子光谱基础研究和应用技术在国民经济和高新技术开发中的广泛应用和技术转化。我们真诚期待着国内外同行在2006年7月相聚在美丽的北方城市——长春。

征文范围

分子光谱理论研究、激光光谱测量、红外、拉曼、振动、紫外、可见、发射、吸收、X射线荧光光谱等在冶金、地质、机械、环保、国防、医药、农林、化工、商检及其他各领域的最新研究成果、学科发展前沿和进展。论文内容未在期刊杂志上发表过或其他全国或国际会议宣读过。具体涵盖下述各方面:

1. 理论研究(振动分析,分子动力学/量子化学计算和结构,光谱线型和强度)
2. 超快现象、时间分辨、非线性效应
3. 二维相关光谱
4. 近红外光谱
5. 表面等离子共振(SPR)技术
6. 表面增强光谱(红外、拉曼、荧光光谱)
7. 红外光谱、拉曼光谱、荧光光谱、磷光光谱、紫外-可见吸收光谱、激光光谱、光谱成像技术等催化及表面/界面科学、分析化学、生物科学、医学、药学、新材料、矿物、地学、工业过程、环境和其他领域的应用。

征文要求

提交论文扩展摘要一份,纸张大小用A4纸版式(用Office word软件排版,页边距为2 cm,单倍行距)。扩展摘要按以下顺序排版:文题(三号黑体居中);作者(四号仿宋居中);单位(小四号宋体居中,含所在省市、邮政编码、电子邮址(如有));论文的创新性,研究意义与结果(五号宋体);主题词和主要参考文献(自版芯左起,五号宋体)。文稿中可穿插主要论据的图、表和照片,图题、图注和表题、表注一律用英文表述。具体投稿要求可参看模板及《光谱学与光谱分析》征稿简则。届时请您登陆我们的网站,将您要提交的论文通过网页上传给我们。也可以通过信件方式投稿。稿件一经录用,将由《光谱学与光谱分析》以增刊形式全文发表。

(下转第 2033 页)