

2'-脱氧-3'-磷酸胞嘧啶-苯醌 加合物的确定*

蒋湘宁 刘淑芬 徐晓白**

(中国科学院生态环境研究所, 北京, 100085)

摘 要

用³²P后标记法, HPLC及PEI-TLC同谱层析等方法对DNA-苯醌(BQ)加合物进行了研究, 并对其中一个主要加合物进行了碱基定位, 确证该斑点系BQ与DNA分子上的2'-脱氧-3'-磷酸胞嘧啶作用形成的加合物(dC-BQ加合物)。

关键词: ³²P后标记, HPLC, 同谱层析, DNA-BQ, dC-BQ加合物

苯醌在生物体内、外代谢均能与DNA(脱氧核糖核酸)形成加合物^[1,2,3,22]。用高灵敏的³²P后标记法分析DNA-BQ(苯醌)加合物时能明显地鉴别出四个放射性加合物斑点, 其中一个较强, 占加合物放射性总量的70%以上^[22]。Jowa等(1986)曾报道过脱氧鸟嘌呤-苯醌(dG-BQ)加合物的形成与结构鉴定, 但未能得到³²P后标记法的验证^[23]。Reddy等(1989)用³²P后标记法分析DNA-BQ加合物时虽也得出DNA与苯醌作用形成的加合物中有一个为主的结论, 但未进一步进行碱基定位^[24]。因此, 两者的实验结果未能得到相互验证, 也不能说明³²P后标记法研究DNA-BQ加合物时斑点来源。本文用单碱基反应、HPLC分离纯化及³²P标记法和PEI-TLC同谱层析等方法对DNA-BQ加合物中的主要斑点进行了结构鉴定, 确证了该主要斑点是苯醌与DNA分子上的脱氧胞嘧啶作用形成的加合物。

材 料 和 方 法

1. 材料

小牛胸腺DNA, Sigma公司(美国)。分析纯, 使用前用核酸酶(RNase)和蛋白酶(Protemase K)及冷乙醇再纯化沉淀一次。小球菌核酸内切酶(Micrococcal endonuclease)和脾核酸外切酶(Spleen exo-nuclease, Worthington Biochemical(美国)。P1核酸酶和T4多核苷酸激酶分别为Boehringer-Mannheim公司(德国), Bethesda Research Laboratories(美国)产品。土豆酯酶和2'-脱氧-3'-磷酸单核苷酸, Sigma公司。高比度(>4000Ci/mmol)无载体³²P-ATP, 中国原子能科学研究院(北京); 苯醌(分析纯), 上海试剂三厂。ODS反相薄层层析板, Whatman公司(美

* 国家自然科学基金资助课题。 ** 通讯作者。

国); 聚乙烯亚胺(Poly-ethyleneimine, PEI)纤维素离子交换薄膜, Macherey-Nagel公司(德国)。

其余试剂和溶剂均为分析纯。根据需要进行必要的纯化与重蒸。缓冲液及实验全过程用水为去离子蒸馏水。

2. 方法

^{32}P 标记前各步操作在常规生化实验室中进行; ^{32}P 标记及标记后各步骤均在放射性同位素实验室中进行。

2.1 DNA-BQ加合物和dN-BQ加合物的形成

DNA-BQ加合物的形成: 主要参考蒋湘宁等(1992)的方法^[1]。

dN-BQ加合物的形成: 分别取浓度为4mmol/L的dNMP[dGMP(脱氧鸟嘌呤单核苷酸), dCMP(脱氧胞嘧啶单核苷酸), dAMP(脱氧腺嘌呤单核苷酸)和dTMP(脱氧胸腺嘧啶单核苷酸)]各0.5ml, 用0.5ml 10mmol/l Tris(pH7.5)的缓冲液稀释, 再加浓度为4mg/ml的苯醌溶液0.2ml(BQ终浓度控制在1.0—1.5mg/ml之间), 在37℃条件下于试管中反应12h后用乙醚萃取以去除反应体系中未反应的苯醌。dNMP的准确浓度用紫外分光光度法测定(终浓度控制在1—2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之间)。

2.2 HPLC纯化与富集

HITACHI&MERCK HPLC; 主要由L-6200智能高压泵, L-4000紫外检测仪和D-2000色谱数据积分仪组成。

色谱柱: ODS 反相色谱柱, 长150mm, 内径10mm; 检测波长为254nm; 流动相: A液为20% 甲醇, 0.1mol/l 乙酸; B液为纯甲醇; 洗脱梯度: 起始(A液)

线性梯度 $\xrightarrow{30\text{min}}$ B液 $\xrightarrow{\text{平衡 } 5\text{min}}$ B液 $\xrightarrow{\text{返回 } 10\text{min}}$ A液 $\xrightarrow{\text{稳定 } 10\text{min}}$ 起始(A液); 流速: 1.0ml/min。

2.3 ^{32}P 后标记法验证

主要参考刘淑芬等(1990)^[2]、蒋湘宁等(1992)^[1]的方法对DNA-BQ, dN-BQ及HPLC收集组分进行 ^{32}P 后标记法分析。

2.4 PEI和TLC同谱层析

^{32}P 标记的DNA-BQ加合物分别与 ^{32}P 标记的3', (^{32}P)5'-二磷酸核苷酸(dGDP, dCDP, dADP和dTDP)混合后点样进行ODS薄层纯化和PEI离子交换薄层分离层析。

结 果 与 讨 论

1. DNA-BQ加合物中主要斑点的碱基定位分析

在离体条件下, 苯醌可以与小牛胸腺DNA作用形成共价键加合物。经 ^{32}P 后标记法检测分析, 在放射性自显影谱图上可以比较清楚地辨认出4个加合物斑点(图1, C), 其中一个较大, 其放射性强度占总量的71%。各斑点的相对强度、相对标记率和DNA碱基修饰率列于表1。

脱氧胞嘧啶与苯醌反应后经 ^{32}P 后标记法分析可以检测出一强一弱两个斑点(图1, D), 其中较强的斑点与DNA-BQ加合物的点4具有相同的迁移率(图1, C, D, E,

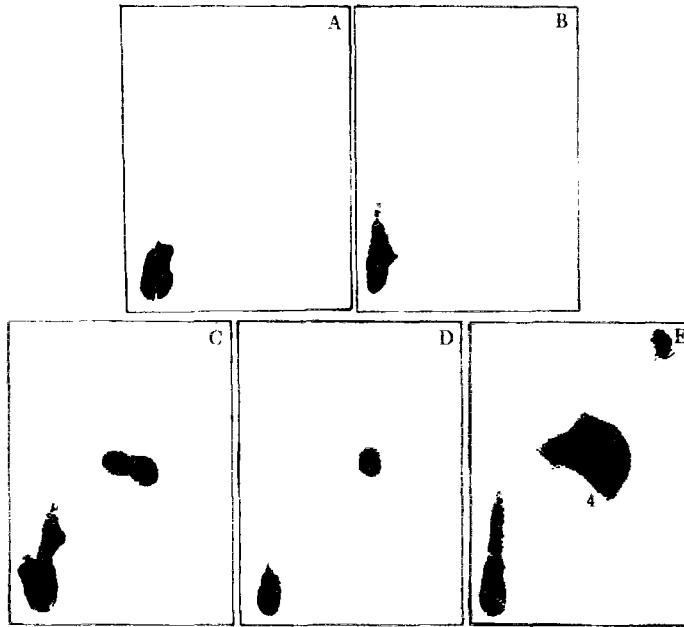


图 1 ^{32}P 后标记法分析检测DNA-BQ及dC-BQ加合物自显影谱图

(A) 小牛胸腺DNA(空白对照); (B) 苯醌对照; (C) DNA-BQ加合物; (D) dC-BQ 加合物;
(E) HPLC富集后dC-BQ

Fig. 1 Autoradiograms of DNA- and dC-BQ adducts

表 1 DNA-BQ加合物计数分析

Table 1 Radioactive count analysis of DNA-BQ adducts

点 号	CPM(7次重复平均)	相对强度(%)	相对标记率(RAL)	碱基修饰率 (1加合物/ 10^{10} 碱基)
1	387.4	8.44	7.97×10^{-9}	79.65
2	434.3	9.46	8.93×10^{-9}	89.29
3	506.6	11.03	10.04×10^{-9}	104.20
4	3252.9	71.07	67.71×10^{-9}	670.90

表2), DNA-BQ和dC-BQ的上述加合物斑点,在以小牛胸腺DNA, dC和BQ为空白对照的样品中均未出现,因此,确定这些斑点是BQ与DNA和dC反应形成的加合物,并初步确定DNA-BQ加合物中的较强点来自于2'-脱氧胞嘧啶(dC-BQ)。此外,其它三种脱氧碱基在试管反应条件下也都能与BQ反应形成DNA加合物。它们与DNA-BQ加合物的对应关系有待证实。

2. HPLC组分收集和 ^{32}P 后标记法验证

在初步确定加合物碱基的基础上,对dC, BQ和dC-BQ反应液以及dC, BQ混合液进行HPLC分析,并确定和收集dC-BQ加合物的组分(图2, C中19.30峰),减压浓缩或氮气流吹干后再用于 ^{32}P 后标记法分析,进一步证明DNA-BQ加合物中的点4来自于2'-脱氧胞嘧啶核苷酸(图1, E)。

表 2 DNA-BQ加合物各斑点及dC-BQ加合物的迁移率
Table 2 Migration of DNA-BQ adducts and dC-BQ adduct

DNA-BQ	R_{fx}	R_{fy}
1	0.005	0.152
2	0.056	0.200
3	0.210	0.258
4	0.256	0.256
dC-BQ	0.256	0.256

3. PEI和TLC同谱层析

考虑到 ^{32}P 后标法分离过程的局限性 (即使是同一加合物在多次实验时, 由于多维 TLC 层析分离过程中也会有斑点位置不重复的现象), 在标记反应之后, 我们将 DNA-

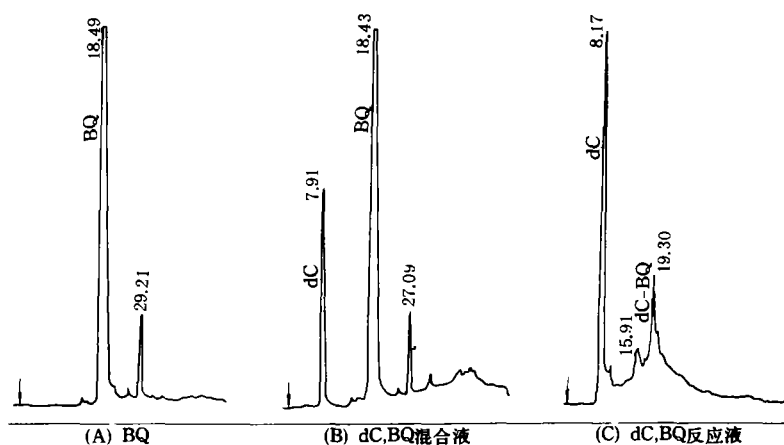


图 2 HPLC纯化富集dC-BQ加合物色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of purification and enrichment of dC-BQ adducts

BQ加合物分别与BQ加合的4种脱氧碱基加合物混合后进行同谱层析分析。结果表明, DNA-BQ加合物中的点4与dC-BQ加合物中的较强点在同谱层析过程中完全具有相同的TLC迁移特性 (图2, A), 而DNA-BQ加合物中的点4在与其它脱氧核苷酸-BQ加合物的同谱层析过程中不具有相同的迁移率而发生分离。在图2(B)还示出DNA-BQ加合物中的点4在与dA-BQ的同谱层析过程中斑点分离现象。

根据对单核苷酸-苯醌加合物(dNMP-BQ)与DNA-BQ加合物谱图的对比、HPLC分离收集 ^{32}P 后标记法验证及TLC同谱层析分析, 可以确定DNA-BQ加合物中的点4来自于2'-脱氧胞嘧啶核苷酸。

Reddy等^[3](1989) ^{32}P 后标记法分析DNA-BQ加合物的结果中, 虽亦有一主要加合物

斑点,但未进行碱基定位。我们通过碱基定位实验和用不同方法相互验证的办法确证了 ^{32}P 后标记实验中DNA-BQ加合物的主要斑点(点4)来自于苯醌对胞嘧啶核苷的修饰,

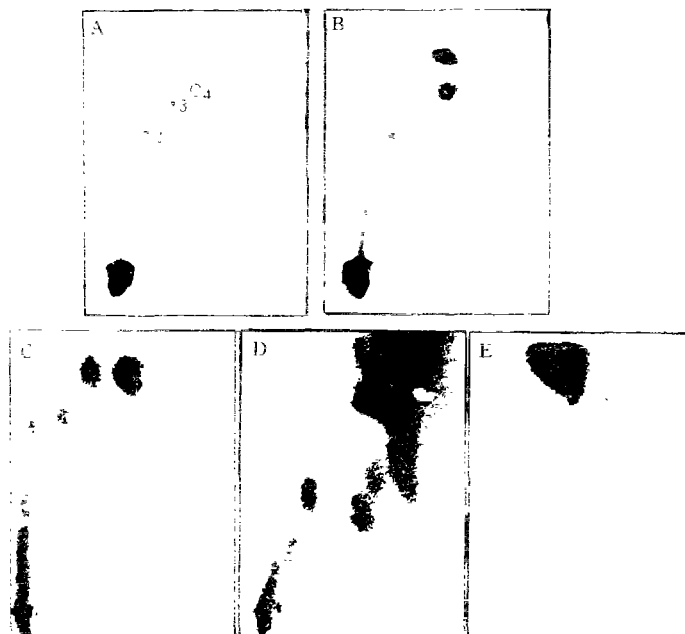


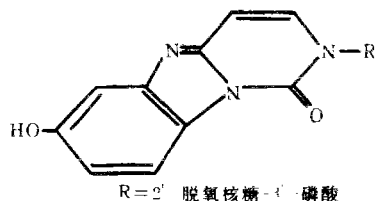
图 3 同谱层析与dC-BQ和dA-BQ纯品验证

(A) dC-BQ和DNA同谱层析; (B) dA-BQ和DNA同谱层析; (C) DNA-BQ加合物; (D) dC-BQ纯品(浓缩品); (E) dA-BQ纯品(浓缩品)

Fig.3 Confirmation of dC-BQ adduct by co-chromatograph with dC- and dA-BQ purities

占加合物放射性总量的70%以上。根据对单核苷酸-苯醌加合物(dNMP-BQ)与DNA-BQ加合物谱图的对比、HPLC分离收集 ^{32}P 后标记法验证及TLC同谱层析分析,可以确定DNA-BQ加合物中的点4来自于2'-脱氧胞嘧啶核苷酸。

在我们的工作结束以后,我们看到了Pongracz和Bodell等(1990)⁶⁵通过大剂量反应合成得到dC-BQ加合物纯品以后再经核磁共振和质谱法对dC-BQ的结构进行了鉴定,得出dC-BQ加合物为(3-hydroxy)-3, N4-benzetheno-2'-deoxycytidine-3'-phosphate,结构式如下:



我们用Bodell实验室赠送的(3-hydroxy)-3, N4-benzetheno-2'-deoxy-cytidine-3' phosphate加合物浓缩品初纯品对我们实验中的点4再次用 ^{32}P 后标记法分析验证,

证实DNA-BQ和dC-BQ加合物中的点4与Pongracz等^[5](1990)得到的dC-BQ加合物(3-hydroxy)-3, N4-benzetheno-2'-deoxycytidine-3'-phosphate是同一个加合物(图3, C, D)。

在用dC-BQ初纯品验证DNA-BQ加合物点4的同时我们还用dA-BQ初纯品做了³²P后标记法实验,发现图1(C)和图3(A)中的DNA-BQ加合物的点3与dA-BQ初纯品具有相同的迁移率,但不与试管反应条件下BQ与dA反应形成的加合物中的较强点(图3(B)中dA-BQ')同谱。在相同条件下BQ与dA和DNA作用形成的加合物是有差异的,前者多个加合物中的较强点(dA-BQ')在后者中并不出现,而在后者中出现的(点3)只是前者多个加合物中的较弱点,这可能是由于DNA的双螺旋结构对DNA分子中dA碱基的亲核位点的屏蔽作用使DNA分子上形成的加合物不同,少于单碱基反应时形成的加合物。³²P后标记法分析DNA-BQ加合物的自显影图谱中4个斑点中的另外2个加合物斑点可能还有Jowa等^[11](1986)报道过的dG-BQ加合物。

致谢:感谢美国加州大学(旧金山分校)Bodell W J教授赠送dC-BQ加合物浓缩品。

参 考 文 献

- [1] 蒋湘宁,刘淑芬,徐晓白,1992.³²P-后标记新法研究DNA-苯醌加合物的生成.环境科学学报,12(4): 407—414
- [2] 刘淑芬, Rappaport S M, Bodell W J, 1990.³²P-后标记法测DNA加合物.环境化学,9(5):18—26
- [3] Reddy M V, Blackburn G R, Irwin S E et al., 1989. A Method for in vitro Culture of Rat Zymbal Gland; Use in Mechanistic Studies of Benzene Carcinogenesis in Combination with ³²P-Postlabeling. *Environ. Health Perspect.*, 82:239—247
- [4] Reddy M V, Bleicher W T, Blackburn G R et al., 1990. DNA Adduction by Phenol, Hydroquinone, or Benzoquinone in vitro but not in vivo; Nuclease P1-Enhanced ³²P-Postlabeling of Adducts as Labeled Nucleoside Bisphosphates, Dinucleotides and Nucleoside Monophosphates. *Carcinogenesis*, 11(8):1349—1357
- [5] Pongracz K, Kaur S, Burlingame A L et al., 1990. Detection of (3'-Hydroxy)-3, N4-Benzetheno-2'-Deoxycytidine-3'-Phosphate by ³²P-Postlabeling of DNA Reacted with *p*-Benzoquinone. *Carcinogenesis*, 11(9):1569—1572
- [6] Levay G, Pongracz K, Bodell W J, 1991. Detection of DNA Adducts in HL-60 Cells Treated with Hydroquinone and *p*-Benzoquinone by ³²P-Postlabeling. *Carcinogenesis*, 12(7): 1181—1186
- [7] Reddy M V, Randerath K, 1987. ³²P-Postlabeling Assay for Carcinogen-DNA Adducts; Nuclease P1-Mediated Enhancement of Its Sensitivity and Application. *Environ. Health Perspect.*, 76:44—47
- [8] Barale R, Marrazzini A, Betti C et al., 1990. Genotoxicity of Two Metabolites of Benzene; Phenol and Hydroquinone Show Strong Synergistic Effects in vivo. *Mutation Research*, 244: 15—20
- [10] Jowa L, Winkle S, Kalf G et al., 1986. Deoxyguanosine Adducts Formed from Benzoquinone and Hydroquinone. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology: Biological Intermediates III* (Kocsis J J, Jollow D J, Witmer C M, Nelson J O, Snyder R Eds), Plenum Publishing Corporation, 1986, pp. 825—832

CONFIRMATION OF 2'-DEOXYCYTIDINE- BENZOQUINONE ADDUCT BY ^{32}P -POSTLABELLING, HPLC AND CO-CHROMATOGRAPHY

Jiang Xiangning Lin Shufen Xu Xiaobai

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy
of Sciences, Beijing, 100085)

ABSTRACT

The major adduct of DNA-BQ and 2'-deoxycytidine-benzoquinone formed *in vitro* reaction has been confirmed as (3-hydroxy)-3, N4-benzetheno-2'-deoxycytidine-3'-phosphate by the combination of the super-high sensitive nuclease P1 mediated ^{32}P -postlabelling version, HPLC enrichment and co-chromatography with dC-BQ adduct compound. It has been shown that the major one, which accounts for more than 70% of the total radioactivities of DNA-BQ adducts detected, is from the deoxycytidine (dC) modified by benzoquinone.

Keywords: ^{32}P -postlabelling, HPLC, co-chromatography, DNA-BQ adducts, dC-BQ adduct