

彗星系统定量检测柠檬醛损伤黄曲霉 DNA 的研究*

罗 曼¹ 黄耀熊² 蒋立科^{1**} 籍 涛² 屠 美²

(¹ 安徽农业大学生物工程系 合肥 230036)(² 暨南大学生物医学工程研究所 广州 510632)

摘 要 理化因素致细胞 DNA 损伤,彗星测试提供了一个直观的方法。采用新型 SCGE 图象分析系统(IMI1.0)将细胞显微分光光度分析与显微成像及图象分析结合,直接检测柠檬醛致黄曲霉核 DNA 损伤,与国际流行的 SCGE 图象分析系统相比,具有分析速度快、便于分析,同时具有中英文可切换界面和多格式输出打印特点。该系统使彗星试验的检测时间缩短 2/3,并提高了准确性,可实现对活细胞多种结构参数、细胞内分子与膜的变化状况同时进行长时间连续的动态瞬间监测,具有广阔应用前景。

关键词: SCGE 图象分析系统,定量检测,柠檬醛,DNA 损伤,黄曲霉

中图分类号:Q939.11 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)03-0341-07

长期以来,人们采用许多方法(如原位杂交、噬菌体展示等)鉴别离子辐射、光辐射和化学试剂对植物、微生物和动物所产生的 DNA 损伤,其方法虽直观,但所需时间长,且因条件限制难以实现。近年来诞生出 SCGE(single cell gel electrophoresis)图象分析方法,用它检测 DNA 损伤^[1],其方法简单准确,所需时间仅 50min。本文通过改进彗星试验的图象分析系统,检测柠檬醛对黄曲霉核 DNA 的损伤,使其分析时间缩短至 15min,首次报道理化因素致黄曲霉 DNA 损伤的快速而准确的定量检测方法。

1 材料方法

1.1 实验菌株

黄曲霉(*Aspergillus flavus*),武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 实验药物

柠檬醛,上海香料厂生产,含量 > 97.6%。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器:新开发的 IMI1.0 单细胞凝胶电泳图象分析系统,电泳仪 DYY-III,北京六一仪器厂产品。

1.3.2 试剂:渗析酶(macerogyme)、纤维素酶(cellulase)和果胶酶(pectolase),均为日本 Yakult,co. 产品。其它试剂见参考文献 [1]。

1.4 方法

1.4.1 原理:理化因子诱发的 DNA 受损细胞经原位裂解、DNA 解链等过程,然后进行碱性电泳,损伤的 DNA 从核中移出并迁移,呈现尾形分布,而未损伤的 DNA 部分保持球形,

* 国家档案局资助项目(903-保-2) ** 通讯作者

作者简介:罗 曼(1963-),女,副教授,博士,研究方向:生物化学与分子生物学。

收稿日期:2001-07-09,修回日期:2001-10-08

再经荧光染色, 荧光显微镜下可观察到二者构成彗星状图样。一定条件下, DNA 迁移距(即彗星长度)和 DNA 含量(荧光强度)分布与 DNA 损伤程度相关, 此即为 SCGE(single-cell gel electrophoresis, SCGE)定量分析基础。

1.4.2 单细胞凝胶电泳 (1) 黄曲霉分生孢子悬浮液及原生质体的制备: 按照 Knoppen^[2] 等人方法, 将柠檬醛毒化培养 48h 的材料, 用含 1% Tween-20 生理盐水从培养基上洗下成熟孢子, 使其均匀分散, 制成悬浮液; 于 2000r/min 离心 20min 收集孢子。取 1.0g 孢子(约 2 支斜面培养的菌量), 加入 4mL 含 1mol/L 巯基乙醇(钠)的 0.1mol/L Tris-HCl, pH9.3 缓冲液(细胞洗涤液), 静置 10min 后, 于 2000r/min 离心 10min(4℃), 重复二次; 再向收集的孢子加入 4ml 山梨醇 + 0.02mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠的溶液(pH5.8~6.2, 含 20mg/mL 渗析酶、60mg/mL 纤维素酶和 30mg/mL 果胶酶), 于 30℃ 下保温, 随时取样镜检, 当约有 15% 左右黄曲霉孢子转变成球形原生体时(约 45min), 置冰箱中止反应 30min, 于 2000r/min 离心 10min(4℃)取原生体沉淀, 放冰箱待用。(2) 含待测样品的琼脂载玻片制作、电泳、染色, 彗星试验参照文献 [2] 进行, 然后在荧光显微镜下观察。但电泳迁移时间不是文献所报道的 20min, 实际为 40min。

1.4.3 仪器的改进与操作 (1) 图象分析系统: SCGE 的图象分析功能主要是通过计算机软件实现的, 彗星试验中所研制的软件采用 Imprise 公司 Borland Delphi5 软件开发系统编写, 在 Microsoft Windows2000/98 或 Windows NT 操作系统中进行(图 1)。即用软件控制 CCD 摄像头(IMAC-CCDS30 768 × 572)用于摄取显微镜所成荧光图象(或通过扫描仪扫描), 再由图象捕捉卡(MATROX-METEOR II PCI)将 CCD 摄像头输出的图象信号送入计算机, 由计算机实现图象的显示用于后续分析。

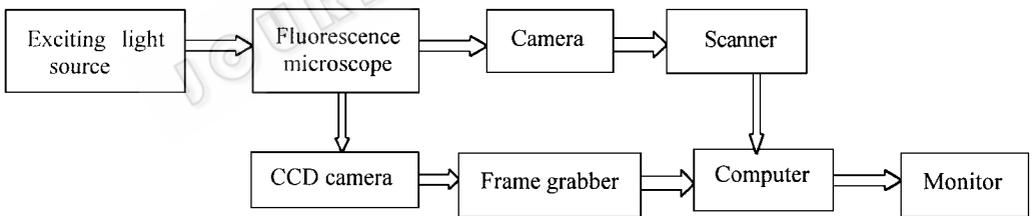


图 1 快速 SCGE 图象分析系统简图

Fig.1 IMH.0 Comet assay analysis composition setup

(2) 分析系统的操作: 理想的光电检测系统是无畸变和无噪声的线性空间不变系统, 尽管 CCD 为积分型元件, 具有较高信噪比, 但在实际系统中各环节仍存在着畸变和噪声, 也不完全符合线性和空间不变要求。因此除了系统制作时需要 CCD 光电响应的不均匀性和非线性进行校正, 以及 CCD 检测通道电路中增益调节电路和 r 校正电路的调整外, 每次利用系统进行 SCGE 分析时还需要通过计算机数字图象处理技术, 对所得图象进行选择后, 由计算机自动完成。为进行统计分析, 对在显微镜下不同放大倍数下所摄取的图象, 仍需对图象进行空间尺度定标, 实现空间尺度参数归一。对上述处理好的图象再从中选择单个样品待分析彗星, 选择适当的阈值(Threshold)确定被选彗星的头部和尾部, 然后计算 SCGE 分析指标。(3) 分析指标的选定: 对彗星实验所选定的分析指标(彗星总体参数:

彗星长、彗星光密度值、彗星重心、彗星分布矩和彗星惯量 ;彗星头参数 :头长、头光密度值、头重心、头分布矩、头惯量和头 DNA% ;彗星尾参数 :尾长、尾光密度值、尾重心、尾分布矩、尾惯量和 Olive 尾矩和尾 DNA% ;彗星尾头比 :尾长/头长、尾分布矩/头分布矩、尾惯量/头惯量及各参数的含义参见文献 [3~5]。鉴于目前国际上尚无标准的 SCGE 图,给因图象信息来源不同所需标准化质控样品的实现带来困难,而对于 SCGE 分析算法的评估仅是对其准确度的评估。故采用计算机模拟生成不同程度的 SCGE 图作为参考。该图由规定形态、灰度分布规律的彗星头和彗星尾组成,即可计算彗星参数理论值。参照彗星模式图(图 2-A),设定“彗星”由相交的椭圆和圆组成,正圆(代表彗星头)内部各像素点荧光光度值为 I ,椭圆和正圆交叠部分各像素点的荧光光度值为 I_1 ,椭圆内部未与圆相交部分(代表彗星尾)各像素点的荧光光度值为 I_2 ($I_1 > I_2$)。

以 Olive 尾距(TM_x)参数的计算为例,对图 2-B 中“彗星”进行分析。 TM_x 公式定义如下;

$$TM_x = \frac{I_T}{I_T + I_H} \cdot |CM_T - CM_H|_x \quad (1)$$

(1) 式中,设彗星分布沿 X 轴方向, CM_T 为彗星尾质心, CM_H 为彗星头质心, I_T 为彗星总荧光强度, I_H 为彗星头总荧光强度。其中,质心(Genter of Mass, CM)定义为:

$$CM_i(x, y) = \frac{1}{I_i} \left[\sum_{x=x_i}^{C_i} \sum_{y=y_i}^{R_i} m(x, y) * x, \sum_{x=x_i}^{C_i} \sum_{y=y_i}^{R_i} m(x, y) * y \right] \quad (2)$$

$$I_i = \sum_{x=x_i}^{C_i} \sum_{y=y_i}^{R_i} m(x, y) \quad (3)$$

(2)(3) 式中, C 为彗星图象像素的列数, R 为彗星图象像素的行数, $m(x, y)$ 为彗星图象中某点的荧光光度值。具体的彗星参数定义公式参考文献 [6~8]。

由于已知彗星头部(正圆)和尾部(椭圆减去与正圆相交所余部分)的空间形态和位置信息及荧光分布规律,按照上式可求出 TM_x 理论值。同理,可根据需要设计成各种复杂的彗星图,相应的各 SCGE 分析指标的理论值可求出,其理论值可成为评判应用 SCGE 算法分析结果的标准。

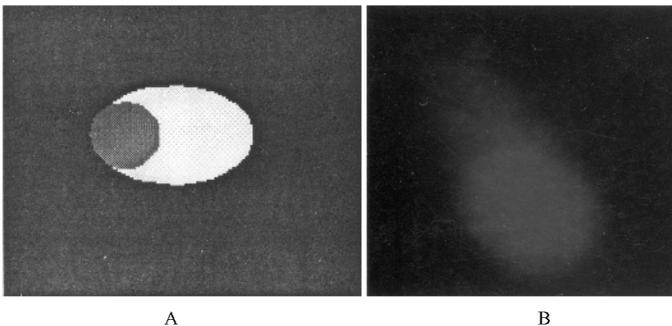


图 2 SCGE 模式图与黄曲霉原生质体 SCGE 图

Fig. 2 Ideograph of SCGE & SCGE image from *A. flavus* protoplasts

A. Ideograph of SCGE ;B. SCGE image from *A. flavus* protoplasts.

1.4.4 观察分析测定:在荧光显微镜下,选择 515 ~ 560nm 波长激发光照射样本,通过 590nm 波长滤光片,在显微镜下可见细胞彗星状荧光图象,同时,该图象也呈现于 CCD 像敏单元,软件控制 CCD 摄像头,随机摄取几个视野下的彗星图象,送入计算机,FISH 软件随机抓取图象,每片达 50 ~ 60 个细胞。

软件分析:使用研制的彗星分析软件逐个对细胞进行分析,各实验组中每个不同计量总计分析 100 个细胞。该系统分析 100 个细胞中的 19 个彗星分析指标,大约需 15min,若采用德国 ZEISS 公司 KS400 彗星分析软件对同一批样品进行分析,则需 50min。

数据处理:将上述软件分析数据转入 SPS90 统计分析软件中进行统计分析。

2 结果

2.1 黄曲霉原生质体 SCGE

改良的琼脂糖凝胶电泳效果与文献 [2] 报道不同,文中实验采用 Honda 缓冲液 [pH 8.5, 2.5% 聚蔗糖 400 (Ficoll 400), 5% 葡聚糖 T-40, 25mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L MgCl₂, 2.5% Triton X-100, 0.4mol/L 蔗糖, 10mmol/L 巯基乙醇(临用前加入)]使黄曲霉原生质体悬浮,然后离心去除清液。再在微碱性电泳缓冲液 (0.08mol/L Tris-HCl, 0.08mol/L 硼酸, 0.002mol/L EDTA, pH8.5) 中进行电泳,时间 90min,才能将损伤的 DNA 排出,获得较好效果。鉴于实验材料是黄曲霉的菌核体细胞或分生孢子,其质膜外壁含较厚的纤维素-半纤维素、果胶以及胡萝卜素和类胡萝卜素氧化聚合物等化学成分,与植物、动物细胞不同,



图 3 黄曲霉原生质体 SCGE 图象

Fig.3 SCGE image from protoplasts of *A. flavus*

电泳前需经脱“壳”处理,得原生质体,使损伤的 DNA 更易迁移。当电泳缓冲液为中性时,溴乙锭插入 DNA 效果虽然好,但在中性条件下损伤的 DNA 难迁移,故采用碱性条件电泳,由于考虑高浓度阳离子(如 Na⁺)会因中和 DNA 所带负电荷而使其迁移不显著,故选用微碱性条件电泳,从而获得较好图象(图 3)。

2.2 图象分析结果

SCGE 分析柠檬醛致黄曲霉核 DNA 损伤是微生物中首例。试验组培养物中所加柠檬醛分 7 个剂量组,终浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、

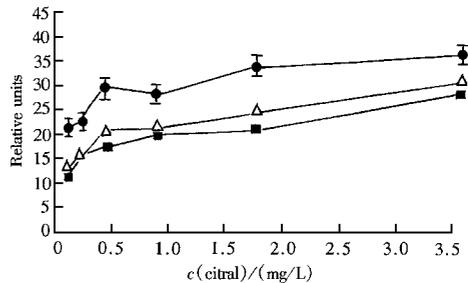


图 4 柠檬醛剂量与彗星尾参数(尾长、Olive 尾矩、尾惯量)间的关系

Fig.4 The relativity of tail length, olive

tail moment and tail inertia with citral dosage

▲—tail length ; —△—Olive Tail inoment ; —■—tail inertia.

2.5、3.0、3.5mg。通过快速 SCGE 图象分析系统对所得 SCGE 图象的进行分析计算。

2.2.1 柠檬醛剂量与彗星尾参数具有相关性 :以彗星尾参数为纵坐标 ,该醛剂量为横坐标作图(图 4)。该图表示尾参数与该醛剂量的关系。通过对每组样品 100 个细胞的彗星尾参数统计分析表明 :尾长、Olive 尾矩、尾惯量与剂量间存在相关性(表 1),且从图中可看出 Olive 尾矩与柠檬醛剂量呈现良好的线性关系 ,而尾长、尾惯量则在一定的剂量范围内存在平台。

表 1 柠檬醛剂量与彗星参数间的对应关系

Table 1 The relativity of comet parameter with citral dosage

Dosage ($\mu\text{g/L}$)	Cells	Tail length	Tail gravity center	Olive tail momentp	Tail inertia	Dispersed moment of tail	The ratio of Tail/Head	Tail DNA / %
0.5	105	12.24 \pm 7.8	27.0 \pm 6.7	4.2 \pm 3.2	500.0 \pm 194.8	17.7 \pm 4.1	0.7 \pm 0.6	3.5 \pm 1.2
1.0	100	34.0 \pm 9.8	28.5 \pm 5.4	6.7 \pm 4.5	829.9 \pm 413.7	22.7 \pm 5.4	2.0 \pm 0.8	56.4 \pm 7.5
1.5	102	33.7 \pm 12.8	28.0 \pm 5.3	10.1 \pm 4.4	808.5 \pm 393.9	22.4 \pm 5.3	1.9 \pm 0.9	58.4 \pm 7.4
2.0	101	36.1 \pm 12.8	34.6 \pm 7.2	11.6 \pm 6.9	1215.4 \pm 635.0	28.1 \pm 7.0	1.6 \pm 0.9	51.9 \pm 10.1
2.5	109	50.1 \pm 16.7	39.2 \pm 9.1	13.9 \pm 9.1	1762.9 \pm 928.2	33.6 \pm 8.9	2.4 \pm 1.2	55.3 \pm 11.2
3.0	121	48.3 \pm 12.8	37.9 \pm 7.9	16.8 \pm 7.5	1539.8 \pm 806.7	31.4 \pm 7.4	2.6 \pm 1.0	61.2 \pm 8.9
3.5	100	57.1 \pm 11.2	38.6 \pm 5.9	20.1 \pm 5.6	1634.5 \pm 539.5	32.2 \pm 5.4	3.4 \pm 1.2	68.9 \pm 5.3
4.0	107	66.9 \pm 11.4	45.9 \pm 7.7	26.4 \pm 6.6	2515.2 \pm 869.4	40.0 \pm 7.3	3.6 \pm 0.9	70.4 \pm 4.3

表 1 中所列参数说明在尾长、Olive 尾矩、尾惯量、尾/头比方面 ,空白对照组与试验组比较差异显著 ,其他指标如尾重心、尾分布矩 ,尾 DNA% 在对照组与各柠檬醛剂量之间也存在差异。

2.2.2 彗星参数间具有相关性 :用 IM1.0 系统对表 1 中参数进行归纳分析 ,表明各参数之间存在较显著相关性(表 2) ,所有相关系数经统计学处理($p < 0.01$) 均具显著意义。

表 2 各参数间相关系数

Table 2 The relativity among parameters

Test item	Tail length	Light density of tail	Tail gravity center	Olive tail moment	Tail inertia	Dispersed moment of tail	Tail DNA / %	The ratio (Tail/Head)
Tail length	1.00	0.72	0.70	0.79	0.79	0.74	0.30	0.71
Light density of tail	0.72	1.00	0.71	0.77	0.74	0.73	0.31	0.58
Tail gravity center	0.70	0.71	1.00	0.73	0.79	0.80	0.22	0.50
Olive tail moment	0.79	0.77	0.73	1.00	0.78	0.77	0.35	0.72
Tail inertia	0.73	0.74	0.71	0.78	1.00	0.83	0.22	0.54
Dispersed moment of tail	0.74	0.73	0.80	0.77	0.83	1.00	0.20	0.52
Tail DNA/ %	0.30	0.31	0.22	0.35	0.22	0.20	1.00	0.40
The ratio of Tail/Head	0.71	0.58	0.50	0.72	0.54	0.52	0.40	1.00

2.2.3 彗星 DNA 含量积分曲线反映 DNA 损伤程度及片段大小(图 5) :选择单个细胞 ,以 DNA 荧光强度为 Y 轴 ,以损伤 DNA 的迁移距离为 X 轴 ,得积分曲线(图 5)。该曲线表明

迁移距离越远,损伤的 DNA 片段越小,曲线峰值越后移,DNA 损伤程度越大。

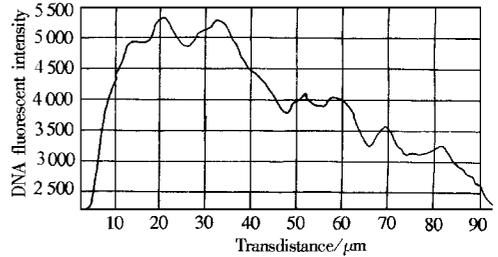
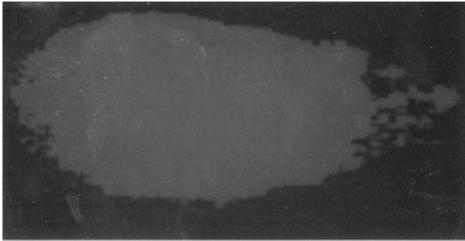


图 5 黄曲霉原生质体彗星形状 DNA 含量积分曲线图

Fig.5 Integral curve of comet image from *A. flavus* protoplasts

3 讨论

3.1 IMI 1.0 图象分析系统的性能

目前在 SCGE 图象分析领域,文献报道仅见英国 KINETTIC、IMAGEIEG 公司的 KOMET 与德国 ZISS 公司的 KS400 两套分析系统,国内尚没有见到相关的分析系统。随着彗星电泳技术的深入开展,现有方法的局限性也逐步显现(1)由于实验条件的波动和分析时人为因素的影响,对 SCGE 图象的分析还需要探索方便有效的分析指标,以提高样本分析数据的准确性和可重复性(2)现有方法主要用于检测 DNA 链断裂,而未能检测其他类型初级 DNA 损害(如 DNA-蛋白质交联)引起的另一类 DNA 初级损害(3)文中研究方法只能提供出整个细胞总 DNA 损伤的信息,而无法识别到何种基因 DNA 序列的损伤。

探索新的有效分析指标是解决上述第一个问题的关键。而 Mckelvey-Marzin^[9]等荧光原位杂交和彗星电泳结合技术,为上述的第二和第三个问题的解决和 SCGE 技术的应用带来的令人激动的新途径。荧光原位杂交技术是检测特定基因结构及其表达,并进行基因定位的一种有效方法,将荧光原位杂交技术和彗星电泳技术有机地结合起来,能够方便地进行单个活细胞水平特定 DNA 损伤的检测,而多荧光探针的使用则能够同时研究几个感兴趣的基因。但迄今还未见有荧光原位杂交和彗星电泳相结合的多光谱的 SCGE 图象分析系统报道。

针对 SCGE 技术所需解决的问题,文中提出了矩迁移率(尾分布矩/头分布矩)和惯量迁移率(尾惯量/头惯量)两个新的较理想分析的指标,并利用显微多光谱荧光成像和图象融合技术自编的 SCGE 分析软件实现了对彗星强度和位置分布的分析计算,从而率先研制出了荧光原位杂交和彗星电泳相结合的多光谱 SCGE 专用图象分析系统。

3.2 柠檬醛对黄曲霉核 DNA 损伤

该实验结果表明柠檬醛是黄曲霉 DNA 链有效断裂剂。文中采用 IMI1.0 系统分析彗星的尾长、尾重心、Olive 尾矩、尾惯量、尾分布矩、尾/头比及尾 DNA% 所得试验结果为首次,这些彗星参数与柠檬醛浓度存在对应关系,这种关系反映了该醛浓度越大,对 DNA 损伤程度越大。实验表明对柠檬醛损伤黄曲霉 DNA 的 SCGE 检测,Olive 尾矩是适合的指标,因为 Olive 尾矩在计算时考虑了彗星的尾长和尾的荧光强度两个因素。若按目前文献报道以尾长作为 SCGE 检测指标,易带来实验误差,因为尾长只考虑尾长度,况且某些药

物可能在引起 DNA 链断裂的同时,发生 DNA-蛋白质交联。

综上所述,将活态单细胞凝胶电泳与显微分光光度图象分析系统结合,通过 CCD 摄像及计算机软件对选定的彗星总体参数、彗星头参数、彗星尾参数、彗星尾头比四类指标进行测定分析,表明对照组与试验组相关数据差异显著,且与观察到的图象变化相吻合;表明物理学光电技术与生化分析交叉,能使人们更深地认识药物在完整活细胞内作用的动静态过程,并通过定性观察与定量测定结合,在一定程度上,能从细胞、亚细胞和分子三个水平阐明药物影响细胞生理功能及某些新陈代谢的规律,对细胞学、药理学及毒理学研究思路及其方法的创新、缩短药物与毒理实验研究周期、加快新药开发应用有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Rojas E , Lopez M C ,Valverde M. *Journal of Chromatography B* ,1999 ,**722** :225 ~ 254 .
- [2] Koppen G ,Verschaevae L. *Mutation Research* ,1996 ,**360** :193 ~ 200 .
- [3] Muller-Pillet V ,Joyeux M ,Ambroise D ,et al . *Environ-Mol-Mutagen* ,2000 ,**36**(1) :52 ~ 58 .
- [4] Logan I D ,Barnett Y A. *Biochem-Soc-Trans* ,1998 ,**26**(1) :86 .
- [5] Daryl W F ,Peggy L O. *Mutation Research* ,1995 ,**339** :37 ~ 59 .
- [6] Kent C R H ,Eady J J ,Ross G M ,et al . *Int J Radiat Biol* ,1995 ,**67**(6) :655 ~ 660 .
- [7] Klaude M ,Eriksson S ,Nygren J ,et al . *Mutation Research* ,1996 ,**363** :89 ~ 96 .
- [8] Bocker W ,Bauch T ,Muller W U ,et al . *Int J Radiat Biol* ,1997 ,**73**(4) :449 ~ 460 .
- [9] Mckelvey-Martin V J ,Mckeown S R. *Mutagenesis* ,1998 ,**13** :1 ~ 8 .

Study on Quantitative Test on the DNA Damage of *Aspergillus flavus* Caused by Citral with a Comet Analysis System

Luo Man¹ Huang Yaoxiong² Jiang Like^{1*} Ji Tao² Tu Mei²

(¹ The Department of Biological Engineering ,Anhui Agriculture University ,Hefei 230036 ,China)

(² Institute of Biomedical Engineering ,Jinan University ,Guangzhou 510632 , China)

Abstract : Comet assay provided a object method for DNA damage caused by physical and chemical factors. A new system of SCGE image analysis ,which combines microphotodensitometry and microphotography with image analysis have been developed. Compared with the international popular ,it has well at speed ,convenience ,exchange face of Chinese and English and print. We used it to directly determine the *A. flavus* ' DNA damages for citral. The results show that test time was shorted 2/3 and accuracy was improved. It is probable that cell structural parameter ,cell molecule and membrane could be test long ,successive ,movably and instantly. So the new system has a wide application .

Key words : SCGE image analysis system , Quantitative test , Citral , DNA damage , *A. flavus*

* Corresponding author