

甲醛致酵母菌与大肠杆菌 DNA-蛋白质交联作用的比较

甘耀坤¹, 徐 钱², 彭光银², 吴 凯², 刘凯于²

(¹广西玉林师范学院化学与生物系 玉林 537000)

(²华中师范大学生命科学院环境科学实验室 武汉 430079)

摘 要:为了探讨甲醛致真核生物与原核生物 DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslinks, DPC)的作用,以毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为材料,采用 KCl-SDS 沉淀法检测液态甲醛染毒后酵母菌与大肠杆菌中 DPC 含量。结果表明,低浓度(25 μ mol/L)甲醛不能引起酵母菌和大肠杆菌的 DPC ($P > 0.05$),而较高浓度(125 和 625 μ mol/L)甲醛可引起酵母菌和大肠杆菌明显的 DPC ($P < 0.05$);另外,酵母菌的 DPC 系数是大肠杆菌的 DPC 系数的 10 倍左右。这表明甲醛致真核细胞和原核细胞的 DPC 作用具有剂量效应关系,而且真核细胞的 DPC 系数比原核细胞的 DPC 系数更高。

关键词: 甲醛; DPC; 毕赤酵母; 大肠杆菌

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0164-04

甲醛是一种常见的装修型化学性室内空气污染物,也是一种生物内源性有机化合物,因其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点,已成为我国主要的室内空气污染物之一。2004 年世界卫生组织下属机构—国际癌症研究中心(IARC)领导的工作小组评估了甲醛致癌效应的相关研究报告后,将甲醛确定为 1A 类物质(人类致癌物)^[1]。许多研究也证实,甲醛具有遗传毒性和致突变性,可以导致 DNA 链断裂(DNA strand breakage, DSB)、DNA-DNA 交联(DNA-DNA crosslinks, DDC)以及 DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslinks, DPC)^[2]。关于甲醛所引起的 DNA 损伤虽然已经做了许多相关的研究^[3-8],但多限于哺乳动物。作为真核生物和原核生物典型代表的酵母菌和大肠杆菌,甲醛对其 DNA 是否具有相同的致损伤效应,国内外却鲜有报道。本研究以毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α)为实验材料,运用 KCl-SDS 沉淀法检测液态甲醛染毒后酵母菌与大肠杆菌中 DPC 含量,从而探讨甲醛致真核生物和原核生物 DNA 损伤的作用,以期更全面更系统地了解甲醛的遗传毒性和致癌性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:本实验所用的材料为毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 。

1.1.2 主要试剂和仪器:10%的福尔马林溶液(Sigma 公司), PBS 缓冲液(无 Ca²⁺、Mg²⁺)、0.4% 苔盼蓝溶液,十二烷基硫酸钠(SDS)、蛋白酶 K(Merk 公司),Hoechst33258 荧光染料、小牛胸腺 DNA(Sigma 公司)其它试剂均为分析纯,低温冷冻离

心机(Eppendorf-5415R)恒温水浴锅(北京长源实验设备厂),超声波仪(Hielscher-UP200S),荧光分光光度计(F-4500,日本日立)。

1.2 染毒

实验采用活体液态染毒:从 YPD 平板上挑取新活化的毕赤酵母单菌落,接种于 50mL YPD 液体培养基中,在 30 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜;另外从 LB 平板上挑取新活化的大肠杆菌 DH5 α 单菌落,接种于 50mL LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜。此时培养基中酵母菌和大肠杆菌的浓度大约为 10⁸ ~ 10⁹ 个/mL。取 0.5mL 的酵母菌(或大肠杆菌)悬液,加入甲醛溶液使其终浓度分别为 25、125、625 μ mol/L,对照组加入蒸馏水,最后将酵母菌置于 CO₂ 培养箱(30 $^{\circ}$ C)中,大肠杆菌则置于另一 CO₂ 培养箱(37 $^{\circ}$ C)中,分别染毒 60min。

1.3 DPC 的检测-KCl-SDS 沉淀法

DPC 采用 KCl-SDS 沉淀法检测^[9-11],SDS 可以和 DPC 以及其它蛋白结合,而不和自由的 DNA 结合;在向样品中加入 KCl 溶液时可使 DPC 和蛋白质沉淀下来,而自由的 DNA 留在上清液中。将上清液转移后,再向沉淀中加入蛋白酶 K 除去蛋白质,使 DPC 中的 DNA 游离出来,并用荧光法测定此 DNA 的含量以及原液中 DNA 的含量,计算交联 DNA 和总 DNA 的比值,进而得出 DNA 和蛋白质的交联程度。

1.3.1 细胞的裂解:酵母菌的裂解:在制备好的细胞悬液中分别加入 0.5mL 2% 的 SDS 溶液并轻微振荡,超声波破壁 30min。大肠杆菌的裂解:在制备好的细胞悬液中分别加入 0.5mL 10% 的 SDS 溶液并轻微振荡,然后将混合液在 65 $^{\circ}$ C 下水浴加热 10min,裂解细胞。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30570799)、湖北省科技攻关计划项目(2005AA307B01)

* 通讯作者。杨 旭, E-mail: yangxu@mail. ccnu. edu. cn

作者简介:甘耀坤(1957-),女,广西容县人,副教授,研究方向为生物化学与分子生物学。Tel: 86-775-2681103, E-mail: gyk195711@163.com

收稿日期: 2006-06-27, 接受日期: 2006-09-04, 修回日期: 2006-10-10

1.3.2 游离 DNA 的分离:从水浴中取出裂解细胞并加入 100 μ L 溶于 20mmol/L Tris-HCl 的 1.0mol/L 的 KCl(pH = 7.5), 将混合液 6 次穿过 1mL 的聚丙烯枪头, 从而使 DNA 长度统一(因 DNA 片段的长度可影响该方法的准确性)。由于 SDS 可以和游离的蛋白质及 DNA-蛋白质交联结合而沉淀下来, 而游离的 DNA 留在悬液中。在冰上冷冻样品 5min 后, SDS-K⁺ 沉淀(包括蛋白质和 DPC)可以形成, 然后 10000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5min 收集沉淀, 并将上清转入另一离心管(5mL)中。再加入 1mL 的清洗缓冲液(0.1mol/L KCl, 0.1mmol/L EDTA, 20mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5)重悬浮沉淀, 在 65 $^{\circ}$ C 下水浴加热 10min, 冰上骤冷 5min, 如前述离心, 如此清洗 3 次, 每次都得上清转入上述离心管中。

1.3.3 DPC 中结合 DNA 的分离:最终的沉淀重悬浮于 0.5mL 的清洗缓冲液中, 然后加入 0.5mL 的蛋白酶 K(0.4mg/mL, 溶于清洗缓冲液中配制), 在 50 $^{\circ}$ C 下消化 3h, 从水浴中取出, 冰上骤冷 5min, 12000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min。收集上清液, 其中包括 DPC 中的 DNA。

1.3.4 DPC 的定量:先制作 DNA 浓度的标准曲线:用清洗缓冲液配制终浓度分别为 0、100、300、500、750、1000、1500、2000、3000、5000ng/mL 的小牛胸腺 DNA 标准液, 紧接着加入 1mL 新鲜配制的 400ng/mL 的荧光染料 Hoechst33258, 使终浓度为 200ng/mL, 置于暗处 30min, 用 F-4500 型荧光分光光度计在 350nm 激发光和 450nm 发射光下测得各浓度的荧光值, 制备标准曲线。将染色后的样品用 F-4500 型荧光分光光度计测定其荧光值, 根据标准曲线来定量交联 DNA 和自由 DNA, 再计算 DPC 系数 η , 其中 ρ_D 为交联 DNA, ρ_F 为自由 DNA。

$$\eta = \frac{\rho_D}{\rho_D + \rho_F}$$

1.4 实验数据统计分析

实验测得的数据用 Origin6.0 统计分析软件分析并进行 t 检验和绘图。

2 结果

2.1 DNA 浓度的标准曲线

DNA 浓度的标准曲线如图 1 所示, 回归方程为: $y = 2.4423 + 0.0028x$, $R^2 = 0.9988$ 。

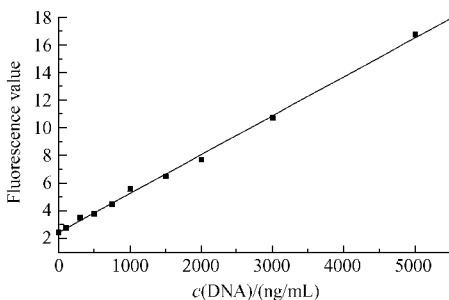


图 1 DNA 浓度的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of DNA concentration.

2.2 液态甲醛致毕赤酵母的 DPC 的浓度效应

经不同浓度的液态甲醛染毒后, 采用 KCl-SDS 沉淀法检

测结果见图 2。实验结果显示:经 25 μ mol/L 液态甲醛染毒处理后, 毕赤酵母的 DPC 系数与对照组相比没有发生显著的变化($P > 0.05$);但是, 当甲醛浓度升高到 125、625 μ mol/L 时, DPC 系数显著上升, 且 DPC 含量与对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。该结果说明液态甲醛在低浓度时, 不引起毕赤酵母的 DNA-蛋白质交联, 在较高浓度时, 甲醛能够显著地诱导毕赤酵母的 DPC 的生成。

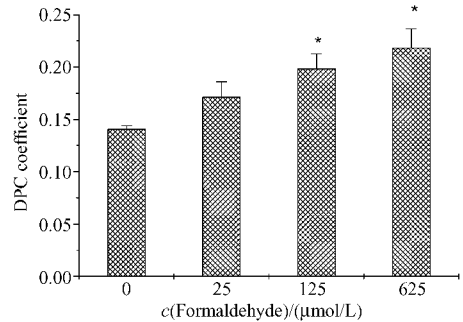


图 2 不同甲醛浓度致毕赤酵母的 DPC 效应

Fig. 2 DPC formation in *Pichia pastoris* at different formaldehyde concentrations. (*: $P < 0.05$, compared with control group)

2.3 液态甲醛致大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 的浓度效应

经不同浓度的液态甲醛染毒后, 采用 KCl-SDS 沉淀法检测结果见图 3。实验结果显示:经 25 μ mol/L 液态甲醛染毒处理后, 大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 系数与对照组相比没有发生显著的变化($P > 0.05$);但是, 当甲醛浓度升到 125、625 μ mol/L 时, DPC 系数显著上升, 且 DPC 含量与对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。该结果说明液态甲醛在低浓度时, 不引起大肠杆菌 DH5 α 的 DNA-蛋白质交联, 在较高浓度时, 甲醛能够显著地诱导大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 的生成。

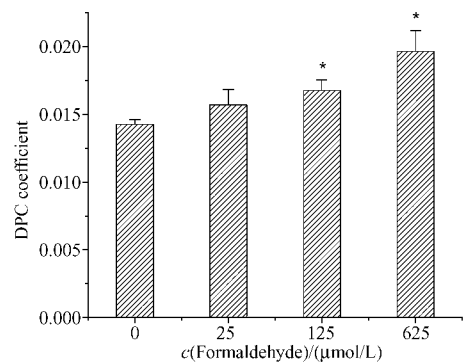


图 3 不同甲醛浓度致大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 效应

Fig. 3 DPC formation in *E. coli* DH5 α at different formaldehyde concentrations. (*: $P < 0.05$, compared with control group)

2.4 液态甲醛致毕赤酵母和 *E. coli* DH5 α 的 DPC 对比效应

图 4 是不同浓度甲醛导致毕赤酵母和大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 效应的组合图。图中除了表明上述的不同浓度的液态甲醛致毕赤酵母和大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 具有相同的剂量效应关系外, 还说明了在同一种浓度的液态甲醛中, 毕赤酵母和大肠杆菌 DH5 α 之间的 DPC 系数也有着极显著性差异。(*: $P < 0.001$ 与同浓度的大肠杆菌 DH5 α 比较), 即大肠杆菌

DH5 α 的 DPC 系数很小 (1.4% ~ 2.4%), 而毕赤酵母的 DPC 系数比较高 (14% ~ 24%), 约是大肠杆菌 DH5 α 的 DPC 系数的 10 倍。

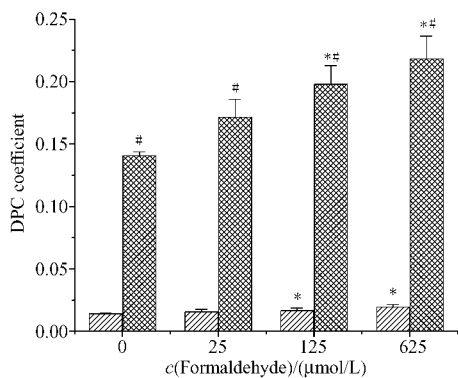


图4 不同甲醛浓度致毕赤酵母(高柱组)和大肠杆菌 DH5 α (低柱组)的 DPC 对比效应

Fig.4 A Comparison between the DPC formation in *Pichia pastoris* (high columns) and *E. coli* DH5 α (low columns) at different formaldehyde concentrations. (*: $P < 0.05$, compared with control group; #: $P < 0.01$, compared with *E. coli* DH5 α group at the same formaldehyde concentrations).

3 讨论

3.1 甲醛致酵母菌和大肠杆菌 DPC 实验的意义

酵母菌和大肠杆菌分别是真核生物和原核生物的典型代表, 由于他们具有结构简单、容易培养等特性, 科学家们常用来作为研究生物机体的某些机理(机制)和基因工程的好材料, 因此探讨甲醛对他们的毒性作用对于进一步研究真核生物和原核生物的生理生化特性及其机理具有一定的指导意义。

本实验结果表明低浓度的甲醛不会引起酵母和大肠杆菌的 DNA-蛋白质的交联, 但是高浓度的甲醛都能引起原核细胞和真核细胞 DNA-蛋白质的交联。这说明控制室内甲醛浓度超标具有重要的意义, 它可以避免或极大地减少对人体的危害。

真核细胞的 DPC 率更高, 这可能是由于在真核生物中, DNA 与组蛋白等结合形成了染色质, 聚集在细胞核中, 而大肠杆菌则不同, 它的 DNA 没有或很少有组蛋白与之作用, DNA 是裸露的。这提示原核细胞可能对甲醛更具有抗性, 将来也许能利用原核细胞高效降解甲醛。

3.2 甲醛导致 DPC 形成的实验

甲醛具有广泛的遗传毒性, 其主要和直接的遗传毒性效应之一就是形成 DPC^[2]。Casanove 等进行了大量的体内实验, 他们证实急性甲醛吸入可诱导大鼠和恒河猴鼻粘膜 DPC 的形成^[3]。Kuykendall 等用甲醛暴露大鼠鼻腔嗅细胞和呼吸道上皮细胞, 得出在 100 μ mol/L 及以上时两种细胞中 DPC 的含量都出现显著增加^[4]。另外本实验室经研究也发现, 在甲醛作用于人血淋巴细胞试验中, 当甲醛浓度在 5 和 25 μ mol/L 时, DPC 的含量和对照组相比无显著性的差异 ($P > 0.05$), 当

甲醛浓度为 125 和 625 μ mol/L 时, DPC 的含量和对照组相比有极显著性的差异 ($P < 0.01$)^[7]; 在甲醛作用小鼠肝细胞的体内试验中, 低浓度气态甲醛 (0.5mg/m³) 不能引起 DNA-蛋白质的交联, 较高浓度气态甲醛 (1.0 和 3.0mg/m³) 可以产生明显的 DNA-蛋白质交联作用^[8]; 在甲醛致人肝癌细胞系 HepG2 体外试验中, 经过低浓度液态甲醛 (25 μ mol/L 和 50 μ mol/L) 处理后, HepG2 细胞的 DPC 系数虽然稍有变化, 但是与空白对照组比较无显著差异, 而当浓度上升至 75 μ mol/L 及以上时, 细胞中 DPC 系数出现了极显著上升 ($P < 0.01$)^[8]。这些试验结果反映出: 甲醛在低浓度时, DNA-蛋白质不引起 DPC 或 DPC 不明显; 在高浓度时, 甲醛能显著地诱导 DPC 的产生。本文采用 KCl-SDS 沉淀法来检测甲醛致酵母菌和大肠杆菌的 DPC 效应, 结果也基本一致。同时通过在同种甲醛浓度中对酵母菌和大肠杆菌的 DPC 含量的比较还得出酵母菌比大肠杆菌更敏感的结论。

3.3 甲醛导致 DPC 形成的机理

甲醛是醛类化合物中最简单的小分子^[12], 其毒性效应的一个重要方面是源于它的羰基亲电性和较小的空间位阻, 使其易于与核酸和蛋白质发生交联。在体内或体外甲醛先与蛋白质或核酸上的自由的氨基反应生成不稳定的羟甲基加合物, 然后再进一步与核酸或蛋白质反应形成稳定的交联物。甲醛所致 DPC 主要是由组蛋白上的赖氨酸残基和 DNA 上的鸟嘌呤共价结合而成, 其主要形式可表示为: histone-NH-CH₂-NH-DNA^[13,14]。DPC 的存在阻滞了 DNA 的正常转录和复制, 会导致染色体断裂、缺失, 基因突变和细胞的死亡, 容易造成一些基因如抑癌基因等丢失^[15]。由于 DPC 是癌变的重要事件之一, 甲醛与 DPC 的量效关系已被用于甲醛致癌性的危险度评价^[16-18]。

4 结论

通过 KCl-SDS 沉淀法实验证实了甲醛在较低浓度 (25 μ mol/L) 时不能诱导 DPC 的形成或者不能显著诱导 DPC 的形成, 在较高浓度 (125 和 625 μ mol/L) 时能够显著诱导 DPC 的形成; 甲醛致真核细胞和致原核细胞的 DPC 具有剂量依赖性, 但甲醛致真核细胞比原核细胞敏感。

参 考 文 献

- [1] International Agency for Research on Cancer. IARC classifies formaldehyde as carcinogenic to humans, 2004-06-15, <http://www.iarc.fr/ENG/Press-Releases/archives/pr153a.html>.
- [2] Conaway CC, Whysner J, Verna LK, et al. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacol Ther*, 71(1-2): 29-55.
- [3] Casanova M, Deyo DF, Heck HD. Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation.

- [4] Kuykendall JR ,Trela BA ,Bogdanffy MS. DNA-protein crosslink formation in rat nasal epithelial cells byhexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production. *Mutation Research* , 1995 **343** 209 – 218.
- [5] 张美荣,周建华,时锡金. 甲醛致 V79 细胞 DNA 交联作用的体外研究. 中国公共卫生, 2005, **21**(1): 43 – 45.
- [6] 张遵真,衡正昌,贺芳,等. 彗星试验检测 DNA 交联的研究. 卫生研究, 2001, **30**(3): 146 – 148.
- [7] 刘英帅,鲁志松,杨继文,等. 甲醛致人血淋巴细胞 DNA – 蛋白质交联作用的定量研究. 湖北预防医学杂志, 2004, **15**(4): 4 – 7.
- [8] 彭光银,赵玮,鲁智松,等. 甲醛致 DNA-蛋白质交联作用及其修复的研究. 环境科学学报, 2006, **26**(2): 331 – 336.
- [9] Zhitkovich A , Costa M. A simple , sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and *in vivo* . *Carcinogenesis* ,1992 , **13**(8) :1485 – 1489.
- [10] Kuykendall JR ,Trela BA ,Bogdanffy MS. DNA-protein crosslink formation in rat nasal epithelial cells byhexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production. *Mutation research* , 1995 , **343** 209 – 218.
- [11] Chakrabarti SK ,Bai CJ ,Subramanian KS. DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds inisolated rat renal cortical cells and its antagonism by specific amino acids and magnesium ion. *Toxicology and Applied Pharmacology* ,1999 **154** 245 – 255.
- [12] George Q ,Anatoly Z. Loss of DNA-Protein Crosslink from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* 2000 , **21**(8) :1573 – 1580.
- [13] Bunde RL ,Jarvi EJ ,Rosentreter JJ ,et al. A piezoelectric method for monitoring formaldehyde induce crosslink formation between polylysine and poly-deoxyguanosine. *Talanta* 2000 **51** :159 – 171.
- [14] Quievryn G , Zhitkovich A. Loss of DNA-Protein Crosslink from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* 2000 **21**(8) :1573 – 1580.
- [15] 夏世钧,吴中亮. 分子毒理学基础. 武汉:湖北科学技术出版社 2001, 129 – 130.
- [16] Casanova M ,Deyo DF , Heck HD. Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats : analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundam Appl Toxicol* ,1989 , **12**(3) 397 – 417.
- [17] Casanova M ,Morgan KT , Steinhagen , et al. Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of Rhesus monkey :pharmacokinetics ,rat-to-monkey interspecies scaling , and extrapolation to man. *Fundam Appl Toxicol* ,1991 **17** 403 – 428.
- [18] Casanova M ,Morgan KT , Gross EA , et al. DNA-protein crosslinks and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fundam Appl Toxicol* , 1994 **23** :525 – 536.

A Comparison between the effects on DNA-protein cross-links of *Saccharomyces* and *E. coli* induced by formaldehyde

GAN Yaokun¹ , XU Qian² , PENG Guangyin² , WU Kai² , LIU Kai-yu²

(¹ Department of Chemistry and Life Science , Yulin Normal College of Gangxi , Yulin 537000 , China)

(² College of Life Science , Central China Normal University , Wuhan 430079 , China)

Abstract :To explore the effect of formaldehyde on DNA-protein cross-links (DPC) in eucaryotic cells and prokaryotic cells , *Pichia pastoris* and *E. coli* DH5 α were chosen as materials to evaluate the amount of DPC induced by liquid formaldehyde *in vivo* by the method of KCl-SDS assay. The results showed that formaldehyde could not induce DPC at low dose (25 μ mol/L , $P > 0.05$) , but could obviously induce DPC at higher dose (125 and 625 μ mol/L , $P < 0.05$). The DPC coefficient in *Pichia pastoris* was 10-fold higher than that in *E. coli* DH5 α . It is concluded that formaldehyde could induce DPC in eucaryotic cells and prokaryotic cells with a dose-dependent manner and the DPC coefficient in *Pichia pastoris* is higher than that in *E. coli* DH5 α .

Keywords : Formaldehyde ; DNA-protein cross-links ; *Pichia pastoris* ; *E. coli*