

• 综述与译文 •

## 基因水平的 DNA 修复研究近况

中国科学院生物物理研究所 曹恩华综述

**摘 要:** DNA 修复机制的研究有了很大的进展,这方面的研究主要是通过辐射敏感性细胞株的分离及修复基因的克隆进行的。DNA 修复基因的研究进一步揭示了 DNA 修复的分子特性,即基因修复具有选择性,并与转录活性有关。

DNA 修复在电离辐射研究领域处于十分重要的地位。近几年来,由于分子生物学,特别是分子遗传学的发展,以及 DNA 序列分析,基因克隆及重组等技术的应用,加之大量哺乳类细胞修复缺陷突变株不断被分离出来, DNA 修复研究尤其在基因水平上的工作,已经在国际上迅速开展。

修复基因研究进展带动了整个 DNA 修复研究,对放射生物学产生了重要影响。本文主要

就 DNA 修复基因分离与克隆, DNA 修复选择机制及修复测定的新方法等某些进展作一简要介绍。

### 一、DNA 修复基因分离与克隆

修复基因的研究是深刻认识 DNA 修复机理及其生物学效应必不可少的途径。它包括基因分离与克隆,基因产物纯化及不同突变株的效应测定等。图 1 概括了达到上述目标的途径。

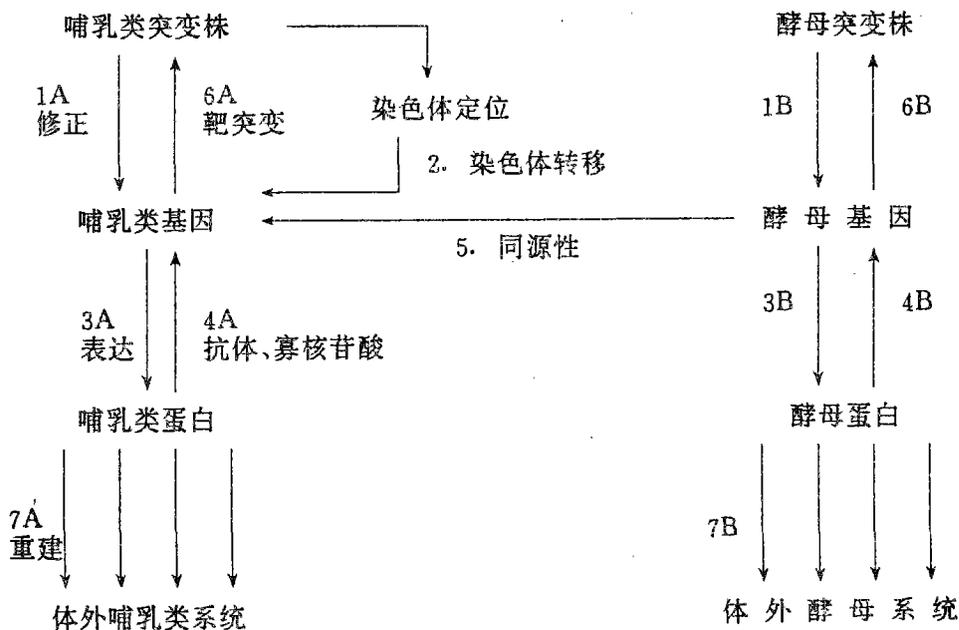


图 1 哺乳类 DNA 修复基因研究示意图<sup>(1)</sup>

图1中,1A,1B;分离DNA修复缺陷突变株,并导入正常DNA修正原突变株中的缺陷基因;2;使用分子生物学技术导入染色体中已知基因;3A,3B;基因插入到表达的运载体中,得到蛋白产物;4A,4B;使用单克隆抗体和寡核苷酸从基因库中分离基因;5;克隆真核基因,分离同源基因;6A,6B;测定靶突变所产生的新突变株的遗传效应;7A,7B;体外通过纯化基因产物和重组技术构建DNA修复系统。

1. DNA修复缺陷突变株的分离

修复基因研究的第一步是分离和鉴定新的辐射敏感的DNA修复缺陷型细胞。辐射敏感性细胞的获得,一方面从培养DNA修复缺陷症患者的人体细胞得到,另一方面从传代培养的野生型细胞诱变而来。

经长期研究,全世界先后报道一些DNA修复缺陷症及其所含互补组列于表1。由此而得到的DNA修复缺陷细胞是研究DNA修复机理的最好材料。

从传代培养的野生型细胞,经诱变亦可得到一些辐射敏感性细胞株。诱变细胞使用最多的是CHO和V79细胞<sup>[3]</sup>,这类细胞生长好,接种率高,突变频率也高,作为基因转移受体细胞时比人细胞更易接收外源基因。也有用小鼠细胞作为诱变细胞来源的。已分离得到的CHO12RO, CHO33RO, XR-V<sub>15</sub>B, irs-1, M<sub>10</sub>, SX-9等都是对X线具有高度敏感性的细胞。最近一些作者<sup>[4]</sup>又报道一些新的辐射敏感性细胞株,如CHO113和xrs-1,他们对X线敏感性比野生型细胞分别提高2倍和3~4倍,其中CHO113细胞对低剂量率辐射有显著的敏感性。还有人用微孔板技术结合新的免疫化学测定方法,得到一种缺乏渗入溴尿嘧啶能力的WMXRS-1细胞株;或用分次X线照射获得一株辐射敏感的人成神经细胞瘤细胞。

2. DNA修复基因的克隆

哺乳类修复基因分离的策略是将从野生型细胞纯化基因组DNA导入有修复缺陷的突变株细胞,使之在细胞内表达,选择修复能力得到

表1 对物理、化学因素高度敏感的DNA修复缺陷症<sup>(5)</sup>

疾 病	因 子	互 补 组
着色性干皮病(XP)	UV	7
Cockayne 综合征(CS)	UV	3
XP-CS 复合型	UV	3
Trichothiodystrophy	UV	1
Familial 黑色素瘤	UV	?
毛细血管扩张失调症	X 线	4
Namegen breakage 综合征	X 线	2
基底细胞癌综合征	X 线	?
Fanconi 贫血(FA)	丝裂霉素	2
Bloom 综合征(BS)	UV?	1

恢复的转化因子。其研究途径包括把人或鼠细胞DNA导入人修复缺陷细胞,分离人的修复基因或与人修复基因有同源性鼠切除修复基因;或者将人细胞DNA导入鼠细胞突变株,分离与鼠突变基因互补的人切除修复基因<sup>[6,6]</sup>。

XP基因克隆:XP基因分离取得了很大进展,但用人或鼠DNA转染的XP细胞,修复缺陷得到恢复的,至今只有Tanaka等<sup>[5]</sup>将小鼠ICR胚胎细胞导入XP20S-SV细胞中成功克隆XP-A修复基因。人或鼠XPAC基因分别位于染色体9q34,1和4C2位置,XP基因编码一个273个氨基酸多肽,多肽内具有一个锌脂蛋白结构区。另一个进展是将ERCC-3 cDNA微注射到不同的XP互补组细胞中,在XPB组中发现UDS缺陷基因得到修正<sup>[7,8]</sup>。Weber等<sup>[9]</sup>证实ERCC-2 cDNA基因能修正XPAC细胞缺陷。

ERCC基因克隆:将人基因组导入鼠细胞,分离人切除修复基因共有8种,其中5种基因被克隆<sup>[9]</sup>。ERCC-1是这类基因中第一个被克隆的人修复基因<sup>[10]</sup>。在XP互补组2,3,5中的ERCC-2、ERCC-3和ERCC-5基因,分别由Weber, Weeda和Mudgett等克隆<sup>[11-13]</sup>。位于染色体13q最大的DNA修复基因ERCC-6,也由Troelstra分离并克隆<sup>[14]</sup>。

最近,一种抗电离辐射基因rad9-192已被克隆,与rad9<sup>+</sup>基因相比较,两者编码的蛋白

质具有相同大小,但 rad9-192 基因单碱基被取代,可引起蛋白质三级结构改变。第一个被克隆的电离辐射修复基因 XRCC-1<sup>[19]</sup>,利用 X

线修复缺陷的转基因鼠,得到了鼠的同源基因<sup>[18]</sup>。到目前为止,已克隆的人修复基因总结于表 2。

表 2 已克隆的人 DNA 修复基因<sup>[1]</sup>

基因	染色体定位	基因大小 (kb)	蛋白质中氨基酸数目	S. Cerevisiae 同源	S. Pombe 同源	基因产物活性
ERCC-1	19q13	15~17	297	RAD10		?
ERCC-2(XP-2)	19q13	20	760	RAD3	rad15	DNA 螺旋酶 <sup>b</sup>
ERCC-3(XP-B)	2q21	45	782	ERCC-3 <sup>SC</sup>	ERCC-3 <sup>SP</sup>	DNA 螺旋酶 <sup>b</sup>
ERCC-5	13q	32				
ERCC-6	10q11	100	>1500			DNA 螺旋酶 <sup>b</sup>
XP-A	9q34	25	273	RAD14		
DNA 连接酶 1	19q13		919	CDC9	CDC17	DNA 连接酶
HHR6A	xq24	15	152	RAD6	rhp6+	Ubiquitin- Conjugating 酶
HH6B	5q23		152			
PolyADP-核糖多聚酶	1q42	43	1043			
MGMT	10		207			O <sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶
BAP1 <sup>a</sup>			323			AP 内切核酸酶
ANPG			230			烷基-N-嘌呤 DNA 糖苷酶
UNG15	12		304			尿嘌呤 DNA 糖苷酶
XRCC-1	19q13	33	633			
KIN17	10p		200			

a) 牛基因

b) 从氨基酸序列推断

哺乳动物修复基因的克隆是一个困难的任务,更困难的是基因产物和功能的测定。为此,已建立了模拟修复合活性作用的体外测定系统<sup>[17,18]</sup>。为跟踪分子缺陷和临床表现之间的关系,DNA 修复缺陷的动物模型系统也将会应运而生。

## 二、DNA 修复基因选择性作用

用 UV 分别照射正常人细胞、CHO 细胞和 XP 细胞,测定其修复能力时,发现正常细胞修复约 55% 的损伤,其存活率达 85%,而 CHO、XP 细胞只能修复 5% 损伤,但 CHO 细胞存活率却与正常细胞一样,XP 细胞存活率仅有 1%。Hanawalt 等<sup>[19]</sup>认为细胞对 DNA 修复是不均一的,以后证实在 CHO 细胞中,对细胞存

活有重要影响的 DHFR(二氢叶酸还原酶)基因区被优先高效修复。活性基因仅构成全基因组的一小部分,显而易见,这种高效修复采用反映全基因组平均修复水平的方法是难以检测的。用核酸内切酶敏感位点的检测方法发现,位于 DHFR 基因内片段有 75% 被修复,而 5' 上游 30kb 处片段只有 10% 被修复,同时全基因组修复只有 15%。由于 CHO 细胞存活只与 DHFR 基因修复有关,与总修复水平无关,而 XP 细胞不具备对活性基因的选择性修复能力,所以存活率很低。

有兴趣的是 Hanawalt 还发现在 XP-C 细胞染色体上 PD 总切除减少,而活性基因仍然被有效修复;另外他进一步发现 CS 细胞在

DNA 修复方面,总修复水平没有缺陷,但在转录活性基因选择性修复方面存在缺陷。因此,他认为深入研究 XP-C 和 CS 细胞 DNA 修复缺陷,能更进一步了解 DNA 修复的分子机理<sup>[16,19]</sup>。

T<sub>4</sub> 核酸内切酶 V 是噬菌体 T<sub>4</sub> 感染宿主 E. Coli 后表达的一种修复酶,它能特异地识别环丁烷嘧啶二聚体(PD)。用此酶为探针,在基因水平和染色质水平分别比较 ADA 基因和 X 染色体 754 基因修复 PD 的能力。结果:活性 ADA 基因比受抑制的 X 染色体 754 基因能更快更有效地修复 PD,在辐照开始后有一个快修复过程。另一方面,转录活性链的基因切除修复能力远远高于转录不活跃链上的基因。类似的现象在 X 射线诱导 ssDNA 实验中也观察到<sup>[21]</sup>,一般来说这方面工作较少。

选择性修复的调控机理还很不清楚,这可能与染色质结构、DNA 序列以及细胞调节体系等有关<sup>[22,23]</sup>。肿瘤的产生与发展,DNA 修复缺陷症以及衰老过程与基因选择性损伤及修复是否有关,引起了人们的极大兴趣。

### 三、基因水平的 DNA 修复检测新技术

DNA 修复测定的定量研究,首先必须精确测定电离辐射诱导 DNA 损伤程度。一般方法如中性洗脱法等给出的剂量响应曲线是非线性的,不能显示特定基因损伤与修复水平<sup>[24]</sup>。因此,基因水平的 DNA 修复检测方法,随分子生物学发展而逐步建立起来。目前真核细胞基因转染技术如磷酸钙共沉淀法、细胞融合等已用于 DNA 修复基因分离、定点诱变、PCR 基因扩增、DNA 序列分析以及生物大分子的印迹技术已广泛用于 DNA 修复基因的测定与分析。

核酸内切酶敏感位点分析法<sup>[25]</sup>是近几年来发展的一种新方法。该法使用放射性前体标志细胞 DNA,UV 照射后与 Endo V 作用,将 DNA 切割为特定片段,分离亲代与子代 DNA,再与 PD 位点的 T<sub>4</sub> 核酸内切酶作用。利用碱性密度梯度离心或碱性洗脱方法,可测定单链断

裂程度。如将与 T<sub>4</sub> 核酸内切酶作用后的样品经碱性琼脂糖凝胶电泳,Southern 转移,与特定基因杂交,可测定 PD 频率和修复效率,从而可知特定基因的修复状态,也可了解染色体结构对修复的影响。目前已分离鉴定出多种特异识别不同 DNA 损伤的糖苷酶,因此上述方法可用于各种细胞类型和多种特定基因的不同 DNA 损伤与修复的研究。

定量测定 DNA 基因损伤方法很多,交变电场凝胶电泳(PFGE)测定 DNA 双链断裂<sup>[26]</sup>方法简便,并能在较短时间内得到结果。在同一凝胶上,可满意地分离 200kb 到 6Mb 片段的样品,一般可测定 1~100Gy 剂量 X 射线所诱发的双链断裂。若与 Southern 印迹技术联用,可测定 30Gy 所致的一种双微染色体损伤修复研究,最低可测剂量达 2.5Gy,并有较好的剂量响应关系。若减少样品制备过程中 EDTA 用量,探测下限为 0.05Gy。

综合运用凝胶微电泳与荧光染色和图像分析技术<sup>[27]</sup>,可测定辐照后单细胞内单、双链断裂。其原理是将细胞埋入琼脂中,用 SDS(十二烷基磺酸钠)处理,电泳、荧光染色后,在显微镜下观察。在辐射敏感性的研究中,它能区分肿瘤细胞亚细胞结构的损伤及不同的修复速率,并可显示 DNA 包装对修复的影响。

体外修复系统包括细胞体系和无细胞体系。Ahn 等人<sup>[28]</sup>发展了一种新的细胞体系,用对氨甲蝶呤有高度敏感性的 EMT-6 鼠细胞研究 DNA 双链断裂,这种细胞所特异的双微染色体上包含多拷贝的 DHFR 基因。Arand<sup>[24]</sup>用 PFGE 和 EB 染色方法测定了细胞经 X 射线照射后所产生的 DNA 损伤。无细胞体系可用于体外选择性修复研究、纯化修复蛋白、克隆编码这些蛋白的基因等<sup>[29]</sup>。其中一种特异方法是使用含有特异修饰碱基的寡核苷酸为底物来估计有类似作用的修复酶如 DRPase 和 DNase 的相对活力。在修复反应中,运用多聚酶抑制剂和合成底物,证明了 DNA 多聚酶  $\beta$  的重要作用。如果将细胞提取物与质粒 DNA

混合保温,经电泳、放射自显影等技术分析,观察到所有 XP 互补组提取物在 UV 照射的 DNA 修复复制中都无效,但加入正常的细胞提取物,这个缺陷得到修正,使用这个系统纯化活性 XP-A 修复蛋白,至少提高 5000 倍,经 SDS-PFGE 分析结合的蛋白约 40kDa<sup>[16,30]</sup>。

#### 四、结束语

基因水平的 DNA 修复研究工作刚开始,初步的结果是十分令人鼓舞的,但也是不完善的。细胞 DNA 修复研究与细胞突变、癌变、衰老、遗传病诊断以及基因治疗有着密切关系。这些都是分子生物学家十分关切的课题,它的意义早就超出放射生物学的范畴,因此基因水平的 DNA 修复研究既有理论意义又有应用前景。

#### 参考文献

- Lehmann AR et al. *Mutat Res*, 1992; 273(1) : 1-28
- Kraemer KH. In *Radiat Research, A Twentieth-Century Perspective*. Vol. II edited by Dewey WC et al. San Diego, Academic press. 1992; 135-142
- Zdzie-nicka M et al. *Cancer Res*, 1989; 49(6) : 1481-1485
- Mckay M et al. *Mutat Res*, 1992; 274(2) : 157-161
- Tanaka K et al. In *Radiat Research, A twentieth-century perspective*. Vol. II edited by Dewey WC et al. San Diego, Academic press. 1992; 229-234
- Thompson LH et al. In *radiat Research, A twentieth-century perspective*. Vol. II edited by Dewey WC et al. San Diego, Academic press. 1992; 251-256
- Weeda G et al. *Cell*, 1990; 62(4) : 777-791
- Weeda G et al. In *Radiat Research, A twentieth-century perspective*. Vol. II edited by Dewey Wc et al. San Diego, Academic press. 1992; 235-238
- Bootsma D. In *Radiat Research, A twentieth-century perspective*. Vol. II edited by Dewey Wc et al. San Diego, Academic press. 1992; 224-228
- Westerveld A et al. *Nature*, 1984; 310(5976) : 425-429
- Weber CA et al. *Mol Cell Biol*, 1988; 8(3) : 1137-1146
- Weeda G et al. *Mol Cell Biol*, 1990; 10(6) : 2570-2581
- Mudgett JS et al. *Genomics*, 1990; 8(5) : 630-633
- Troelstra C et al. *Mol Cell Biol*, 1990; 10(11) : 5806-5813
- Thompson LH et al. *Mol Cell Biol*. 1990; 10(11) : 6160-6171
- Tanaka K. *Mutat Res*, 1992; 273(3) : 237-241
- Wood RD et al. *Cell*, 1988; 53(1) : 97-106
- Sibghat-Ullah I et al. *Nucleic Acid Res*, 1989; 17(11):4471-4484
- Hanawalt PC. *Mutat Res*, 1991; 247(3) : 203-210
- Leon HF et al. In *Radiat Research, A twentieth-century perspective* Vol. II edited by Dewey WC et al. San Diego, Academic Press, 1992; 155-159
- Chiu S et al. *Biochim Biophys Acta*, 1982; 699(1) : 15-21
- Bedford JS et al. In *Radiat Research, A twentieth-century perspective* Vol. II edited by Dewey WC et al. San Diego, Academic Press, 1992; 155-159
- Olive PC, *Int J Radiat Biol*, 1992; 62(4) : 389-396
- Arrand JE et al. *Int J Radiat*, 1992; 61(6) : 717-720
- Bohr VA et al. *DNA Repair, A laboratory manual* Vol. 3 edited by Friedberg EC & Hanawalt PC, New York, Marcel Dekker, 1988; 347-365
- Dolf G et al. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1991; 3(1) : 48-54
- Olive PL et al. *Cancer Res*, 1991; 51(18) : 4671-4576
- Ahn SY et al. *Int J Radiat Biol*, 1991; 59(4) : 661-675
- Strike P. *Mutat Res*, 1992; 293(2) : 79-87
- Coverley D et al. *Nature*, 1991; 349(6309) : 538-539