

I. BIAŁKA—PROTEINS—БЕЛКИ

1. Nukleoproteidy
Nucleoproteins
Нуклеопротейны

Błażej Różga, Aneta Koceva-Chyła, Elżbieta Poziomska

Tadeusz Tranda, Wanda Leyko

ZASTOSOWANIE DWUCHLOROWODORKU KWASU 3,5-DWUAMINOBENZOESOWEGO
DO FLUORYMETRYCZNEJ IDENTYFIKACJI DNA LIMFOCYTÓW LUDZKICH
W ALKALICZNYM GRADIENTCIE GĘSTOŚCI SACHAROZY

W pracy zastosowano fluorymetryczną metodę z DABA x 2HCl do określenia lokalizacji DNA we frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy. Używano limfocyty ludzkie pobudzone do transformacji blastycznej fitohemaglutyniną (PHA+), limfocyty ludzkie niepobudzone (PHA-) oraz handlowy preparat DNA z grasicy cielęcej (Sigma Chem. Co.). Uzyskane dane wykazały, że wyniki fluorymetrycznego oznaczenia DNA limfocytów ludzkich przy użyciu DABA x 2HCl we frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy zgodne są z wynikami uzyskanymi metodą radioizotopową, zarówno w przypadku limfocytów nienapromieniowanych, jak i napromieniowanych, a metoda ta może być zastosowana do badań mas cząsteczkowych DNA przy pomocy wirowania w gradientach gęstości sacharozy bez konieczności uprzedniego znakowania komórek.

WSTĘP

Wirowanie w alkalicznym lub neutralnym gradientie gęstości sacharozy po bezpośredniej lizie komórek na szczycie gradientu jest powszechnie używaną metodą do badań pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA powstałych w wyniku popromiennych uszkodzeń jej cząsteczki. Jedną z bardzo czułych i najczęściej stosowanych metod do określenia lokalizacji DNA we frakcjach gradientu jest

metoda radioizotopowa. Zastosowanie tej metody wymaga wcześniejszego wyznakowania DNA, które może być prowadzone *in vivo* przez iniekcję radioaktywnego prekursora do organizmu [18] lub *in vitro*, w hodowli komórkowej [10]. Główną niedogodnością znakowania *in vivo* jest niska aktywność specyficzna otrzymanych w ten sposób kwasów nukleinowych, a także wysoki koszt i długi okres czasu, jaki jest potrzebny do wyraźnego wyznakowania DNA. Znakowanie DNA w hodowli komórkowej umożliwia wprowadzić syntezę DNA o wysokim poziomie wyznakowania w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, ale może być zastosowane tylko dla komórek dzielących się i w przypadku limfocytów ludzkich wymaga pobudzenia ich do transformacji blastycznej.

Inne trudności, które należy brać pod uwagę w interpretacji wyników doświadczeń z radioaktywną tymidyną, to uszkodzenie komórek przez wewnątrzjądrową radiację, wynikającą z rozpadu ^3H - lub ^{14}C -tymidyny [2, 7, 9, 22]. Jak wykazano w pracach szeregu autorów, włączenie radioaktywnego prekursora do DNA prowadzi do uszkodzenia cząsteczki biopolimeru podobnego do uszkodzeń spowodowanych przez ekwiwalentne dawki promieniowania X lub gamma [3, 4, 8, 16], a dodanie ^3H -tymidyny do hodowanych *in vitro* limfocytów ludzkich powoduje powstanie aberracji chromosomowych [13].

W naszej pracy nad uszkodzeniami DNA limfocytów ludzkich z krwi obwodowej powstałych w wyniku promieniowania gamma sprawdziliśmy możliwość zastosowania opisanej w 1958 r. przez K i s s a n e i R o b i n s a [12] fluorymetrycznej metody oznaczania DNA przy użyciu DABA x 2HCl do identyfikacji DNA we frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy, sprawdzając m. in. wpływ następujących czynników na wynik oznaczenia:

- zależność natężenia fluorescencji od czasu między przygotowaniem a pomiarem fluorescencji próby DNA,
- precypitacja DNA,
- stężenie sacharozy w gradiencie.

MATERIAŁ I METODY

W pracy używano limfocyty ludzkie pobudzone do transformacji blastycznej (PHA^+) i znakowane [Metylo- ^3H]-tymidyną, limfocyty

ludzkie niepobudzone (PHA-) oraz handlowy preparat DNA z grasicy cielęcej (Sigma Chem. Co).

Limfocyty ludzkie izolowano z krwi obwodowej pobranej na heparynę. Erytrocyty po dodaniu metylocelulozy sedimentowano gravitacyjnie w temp. 37°C . Granulocyty i makrofagi usuwano przez 15-minutową adherencję na szkle w temp. 37°C .

1. Hodowla komórek i znakowanie DNA

Hodowlę komórek opracowano na podstawie metody podanej przez Chessina i wsp. [5].

Hodowlę limfocytów prowadzono w medium 199 zawierającym 20% surowicy cielęcej, antybiotyki (100 μg streptomycyny + 120 j. penicyliny) i PHA (0,01 ml na 1 ml medium) w 37°C przez 48 godz., a następnie znakowano DNA przez 18 godz. [Metylo- ^3H]-TdR o aktywności specyficznej 2Ci/mmol w ilości 2 μg na 1 ml hodowli.

2. Wirowanie DNA w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy

Wirowanie DNA w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy prowadzono wg metody McGrath i Williams [14]. Skład gradientu: 5-20% sacharoza w 1,0 M NaOH, 0,9 M NaCl i 0,001 M EDTA (pH 12). Zawiesinę 0,1 ml komórek w PBS (zbuforowany roztwór soli fizjologicznej) lizowano na szczycie gradientu w temperaturze pokojowej przez 60 min 0,5 M NaOH i 0,1 M EDTA. Wirowanie uwolnionego w wyniku lizy DNA wykonywano w ultrawirówce L5-65 Beckman przy użyciu rotora SW-60 w temp. 10°C i 30 000 obr./min przez 90 min. Zbierano 30 frakcji 5-kropłowych. Do każdej frakcji dodawano albuminę wołową i zimny 10% TCA i pozostawiano na noc w temp. 4°C w celu precypitacji osadu. Dalszy tok postępowania był różny w zależności od sposobu oznaczania DNA we frakcjach gradientu.

Położenie DNA we frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy w celu porównania określano dwoma metodami: przez pomiar radioaktywności poszczególnych frakcji oraz fluorymetrycznie przy użyciu DABA x 2HCl.

3. Oznaczanie DNA we frakcjach gradientu gęstości sacharozy przez pomiar radioaktywności

Frakcje gradientu filtrowano przez filtry nitrocelulozowe (Millipore typ HA 0,45 μ). Filtry płukano dwukrotnie 5% zimnym TCA i suszono. Radioaktywność frakcji zliczano w naczynkach scyntylicyjnych zawierających 5 ml toluenowego roztworu scyntylatora (Scyntol-3-Koch Light Lab., rozcieńczanego 24 objętościami toluenu) na Spektrometrze LS-8100 Beckman.

4. Fluorymetryczne oznaczanie DNA we frakcjach gradientu gęstości sacharozy przy użyciu DABA x 2HCl

Wytrącony wraz z albuminą DNA wirowano przy 3000 obr./min przez 15 min. Supernatant usuwano przez odsysanie; a osad przemywano kolejno: 2 razy zimnym 5% TCA, 1 raz alkoholowym roztworem 0,1 M CH_3COOK w temp. 60°C, 1 raz absolutnym alkoholem w temp. 60°C. Po każdorazowym przemyciu osad wirowano przy 3000 obr./min przez 15 min. Otrzymany osad suszono przez noc w temp. 60°C, dodawano 50 μg wodnego roztworu 2M DABA x 2HCl, intensywnie mieszano i inkubowano 60 min w temp. 60°C. Po ochłodzeniu dodawano 1,5 ml 0,6 N KClO_4 i po godzinie określano fluorescencję próby przy emisji 510 nm i ekscytacji 410 nm na spektrofлуorymetrze Aminco Bowman, USA lub Jobin Yvon JY-3.

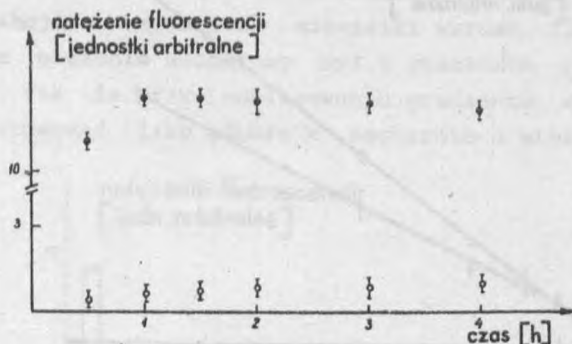
5. Obliczenia masy cząsteczkowej i stałej sedymntacji DNA

Stałą sedymntacji s_{20} obliczano z zależności B u r g i - H e r s h e y [1] zmodyfikowanej przez M c G r a t h i W i l l i a m s [14], natomiast masę cząsteczkową DNA dla wirowania w warunkach alkalicznych wg S t u d i e r a [20].

WYNIKI I OMÓWIENIE WYNIKÓW

W celu określenia zależności natężenia fluorescencji od czasu oznaczano fluorescencję 2 μg DNA i próby zerowej w różnych

odstępach czasowych między przygotowaniem próby, a pomiarem natężenia fluorescencji (rys. 1).



Rys. 1. Zależność natężenia fluorescencji od czasu przechowywania próby, ● - 2 µg DNA, ○ - próba kontrolna

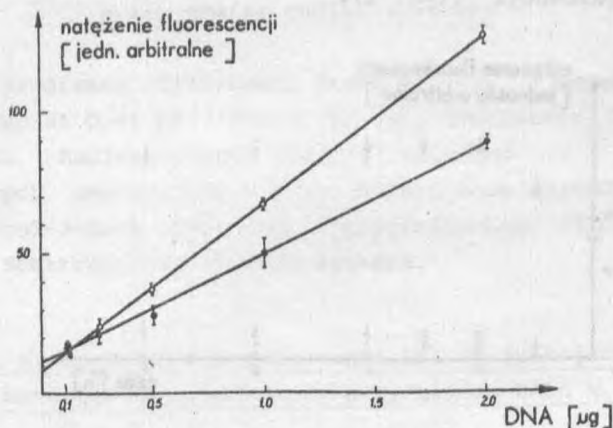
The dependence of the intensity of fluorescence upon the storage time of the samples, ● - 2 µg DNA, ○ - control probe

Abhängigkeit der Spannung der Fluoreszenz seit der Lagerung der Probe, ● - 2 µg DNS, ○ - die Kontrolle

Stwierdzono, że roztwór DNA o stężeniu 2 µg wykazuje maksimum natężenia fluorescencji po 1 godzinie, które utrzymuje się na stałym poziomie do 4 godzin od chwili rozpoczęcia pomiaru, a fluorescencja próby zerowej wzrasta w niewielkim stopniu (statystycznie nieistotnie) w miarę upływu czasu. Z tych względów jako optymalny czas pomiaru fluorescencji należy uważać okres 1 godziny od chwili zakończenia przygotowania próby.

W początkowych eksperymentach sprawdzano zależność między stężeniem DNA a natężeniem fluorescencji dla DNA występującego w osadzie oraz dla DNA rozpuszczonego w 1 N NH_4OH z pominięciem procedury otrzymywania i przemywania osadu opisanej w metodach (rys. 2).

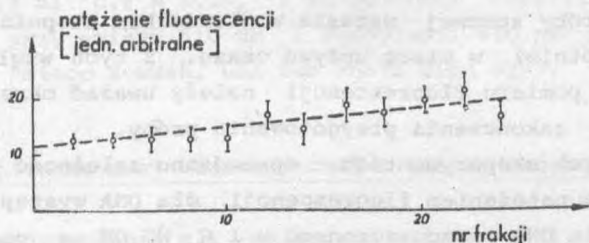
Wyniki uzyskane z krzywych standardowych dla DNA grasicy cieplej w zakresie 0,1-2 µg wykazały, że wytrącenie DNA wraz z albuminą wołową i przemywanie osadu powoduje obniżenie fluorescencji o ok. 25% w stosunku do analogicznych ilości DNA otrzymanych z pominięciem tej procedury. Prezentowana metoda pozwala jednak na określenie zawartości DNA w ilości 10^{-7} g.



Rys. 2. Krzywe standardowe do fluorymetrycznego oznaczania DNA w reakcji z DABA $\cdot$ 2 HCl: o - DNA w 1 N NH_4OH , • - DNA po precypitacji z albuminą.

The standard curves for fluorimetric assay of DNA in the reaction with DABA $\cdot$ 2HCl: o - DNA in 1 N NH_4OH , • - DNA after the precipitation with albumin

Die Standardkurven zur fluorymetrischen Kennzeichnung der DNS in der Reaktion mit DABA $\cdot$ 2HCl: o - DNS in 1 N NH_4OH , • - DNS nach der Präzipitation mit dem Albumin

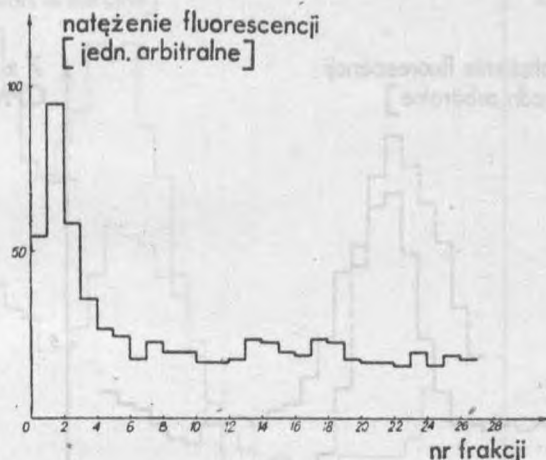


Rys. 3. Zależność natężenia fluorescencji od gęstości sacharozy w kolejnych frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy

The dependence of the intensity of fluorescence upon the density of sucrose in the following fractions of the alkaline sucrose density gradient

Die Abhängigkeit der Spannung der Fluoreszenz von der Dichtigkeit der Sacharose in folgenden Fraktionen des alkalischen Gradienten der Dichtigkeit von Sacharose

Pomiar fluorescencji frakcji gradientu gęstości sacharozy przedstawiony na rys. 3 dowodzi, że wzrost stężenia sacharozy nie wpływa znacząco na wartość natężenia fluorescencji poszczególnych frakcji. Obserwowany niewielki wzrost fluorescencji wraz ze wzrostem stężenia sacharozy był w granicach próby zerowej (rys. 1), tak że przy analizowaniu gradientu można go pominąć, lub stosować jako odnośnik sacharozę o stężeniu 12%.



Rys. 4. Profil rozkładu DNA grasicy cielęcej w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy

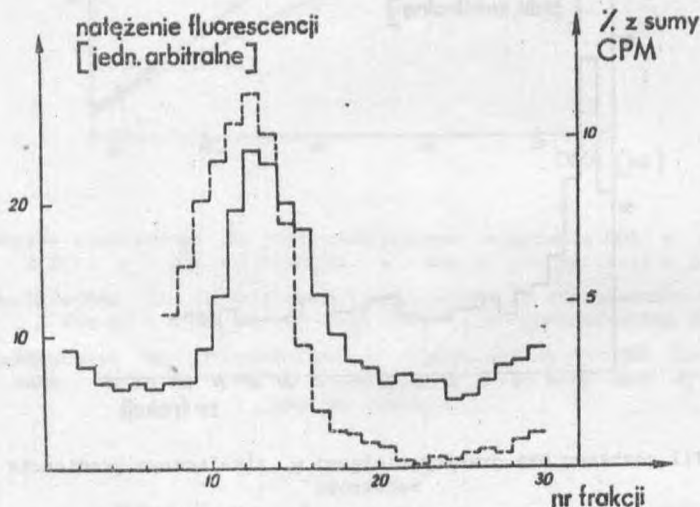
Zone sedimentation pattern of DNA obtained from calf thymus in alkaline sucrose density gradient

Das Profil des Zerfalls von DNS des Kalbsthymus im alkalischen Gradient der Dichtigkeit von Sacharose

W celu określenia przydatności fluorymetrycznej metody oznaczania DNA z DABA x 2HCl do określania lokalizacji DNA we frakcji alkalicznego gradientu gęstości sacharozy wirowano DNA z grasicy cielęcej (Sigma Chem. Co) (rys. 4), DNA limfocytów ludzkich znakowanych (Metylo-³H)-tymidyną (rys. 5), DNA limfocytów ludzkich napromieniowanych dawką 10 kiloradów promieniowania gamma ⁶⁰Co (rys. 6) oraz DNA niepobudzonych limfocytów ludzkich z krwi obwodowej (rys. 7).

Na podstawie przedstawionych danych można sądzić, że fluorymetryczna metoda z DABA x 2HCl pozwala na identyfikację DNA

we frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy. Wirowanie DNA z grasicy cielecej wykazało, że naniesiona na gradient próbka 4 μg DNA po odwirowaniu jest możliwa do identyfikacji, a na podstawie wartości natężenia fluorescencji można sądzić, że nie jest to graniczna ilość DNA, jaka może być zidentyfikowana tą metodą. Możliwe jest również określenie lokalizacji DNA po liczbie 10^4 limfocytów.



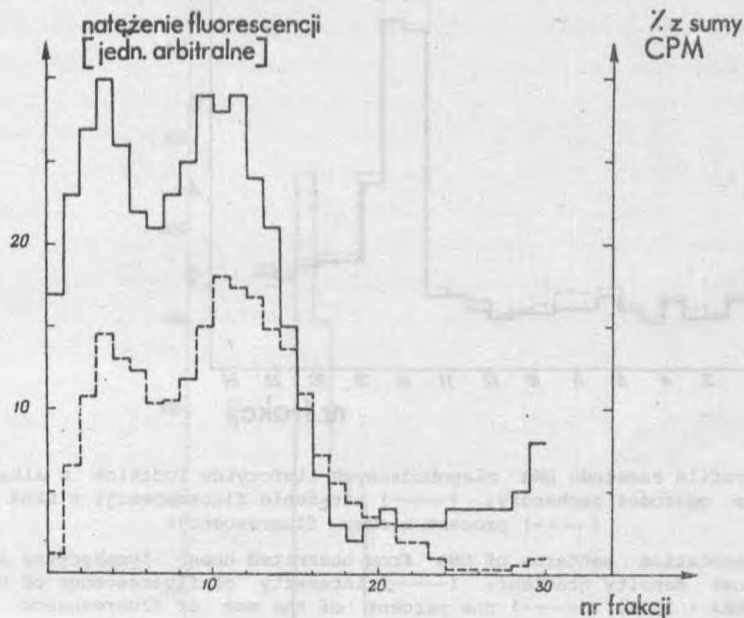
Rys. 5. Profile rozkładu DNA limfocytów napromieniowanych w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy uzyskane metodą fluorymetryczną (—) oraz metodą radioizotopową (----)

Zone sedimentation patterns of lymphocytes DNA unirradiated in the alkaline sucrose density gradient obtained using the fluorimetric method (—), radioisotope method (----)

Die Profile des Zerfalls DNS der unbestrahlten Lymphozyten im alkalischen Gradient der Dichtigkeit von Sacharose, die mit Hilfe folgender Methoden gewonnen wurden der fluorymetrischen Methode (—), der radioisotopischen Methode (----)

Rozkłady DNA w gradiencie gęstości sacharozy uzyskane metodą fluorymetryczną i radioizotopową są zbliżone, a średnie wagowe masy cząsteczkowe (M_w) uzyskane tymi metodami odpowiadają sobie. M_w dla DNA limfocytów ludzkich uzyskane przez pomiar

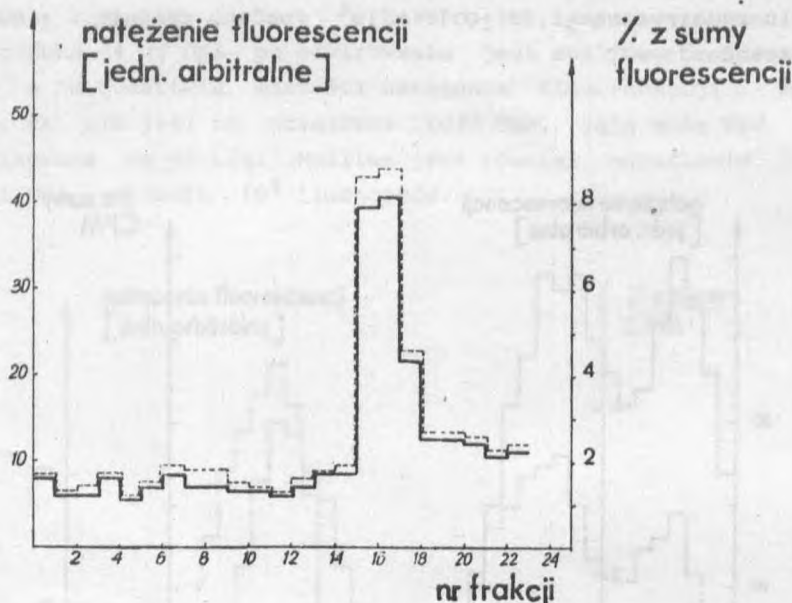
radioaktywności wynosi $1,76 \pm 0,11 \times 10^8$, natomiast uzyskane metodą fluorymetryczną $1,57 \pm 0,17 \times 10^8$ (podano średnią, $\pm$ odchylenie standardowe).



Rys. 6. Profile rozkładu DNA z limfocytów napromieniowanych dawką 10 kiloradów promieniowania gamma w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy uzyskane metodą fluorymetryczną (—) i metodą radioizotopową (----)

Zone sedimentation patterns of lymphocytes DNA irradiated with the dose of 10 krad of gamma-irradiation in alkaline sucrose density gradient obtained using fluorimetric method (—), radioisotope method (----)

Die Profile des Zerfalls der DNS aus den mit Dose von 10 Kiloradium der Gamma-Strahlung bestrahlten Lymphozyten, gewann man im alkalischen Gradient der Dichtigkeit von Sacharose mit Hilfe fluorymetrischen Methode (—), mit Hilfe der radioizotopischen Methode (----)



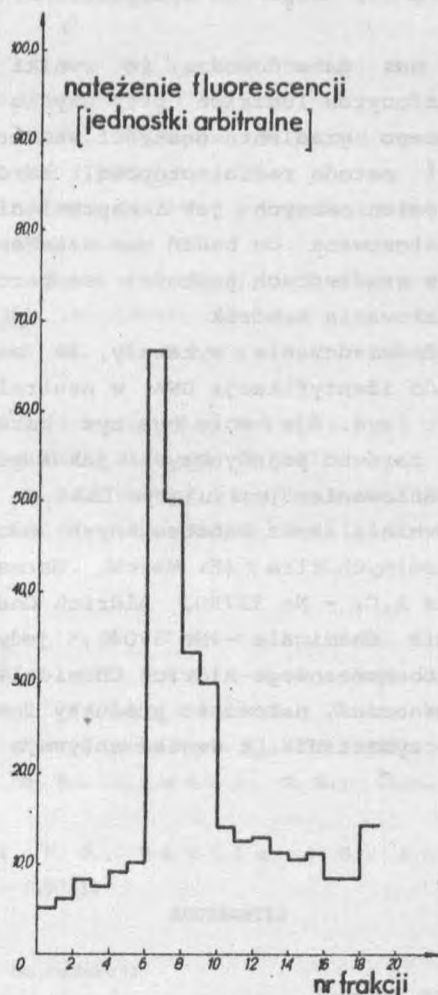
Rys. 7. Profile rozkładu DNA niepodbudzonych limfocytów ludzkich w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy: (—) natężenie fluorescencji z DABA · 2HCl, (----) procent z sumy fluorescencji

Zone sedimentation patterns of DNA from unexcited human lymphocytes in alkaline sucrose density gradient: (—) intensity of fluorescence of DNA with DABA · 2HCl, (----) the percent of the sum of fluorescence

Die Profile des Zerfalls der DNS unerweckter menschlicher Lymphocyten im alkalischen Gradient der Dichtigkeit von Sacharose: (—) die Spannung der Fluorescenz DNS mit DABA · 2HCl, (----) Procent aus der Summe der Fluoreszenz

DYSKUSJA

Metodę fluorymetrycznego oznaczania DNA przy użyciu DABA x 2HCl opisaną po raz pierwszy przez Kissane i R o b i n s a, później modyfikowaną przez S a n t o i a n i i wsp. [19], S w i t z e r i wsp. [21], R o b e r t s o n i wsp. [17], C a t t o l i c o i wsp. [6] stosowano do identyfikacji DNA z hodowanych leukocytów myszy L5 178X przez O n o i O k a d a [15] w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy



Rys. 8. Profil rozkładu DNA z limfocytów ludzkich nienapromieniowanych w neutralnym gradiencie gęstości sacharozy uzyskane z identyfikacji DNA metodą fluorymetryczną z DABA · 2HCl

Zone sedimentation pattern of the DNA from human lymphocytes unirradiated in neutral sucrose density gradient obtained by identification of the DNA using the fluorimetric method with DABA · 2HCl

Das Profil des Zerfalls der DNS menschlicher unbestrahlter Lymphozyten im neutralen Gradient der Dichtigkeit von Sacharose, das aus der Identifizierung der DNS mit Hilfe der fluorymetrischen Methode mit DABA · 2HCl gewonnen wurde

oraz przez K a p p i wsp. do wykrywania mikroilości DNA w gradiencie CsCl.

Uzyskane przez nas dane dowodzą, że wyniki fluorymetrycznego oznaczenia DNA limfocytów ludzkich przy użyciu DABA x 2HCl w frakcjach alkalicznego gradientu gęstości sacharozy są zgodne z wynikami uzyskanymi metodą radioizotopową, zarówno w przypadku limfocytów nienapromieniowanych jak i napromieniowanych, a metoda ta może być zastosowana do badań mas cząsteczkowych DNA przy pomocy wirowania w gradientach gęstości sacharozy bez konieczności uprzedniego znakowania komórek.

Nasze wstępne doświadczenia wykazały, że metodę tę można stosować również do identyfikacji DNA w neutralnym gradiencie gęstości sacharozy (rys. 8), może ona być bardzo przydatna do oznaczenia ilości zarówno pojedynczych jak i podwójnych pęknięć uszkodzonego promieniowaniem jonizującym DNA.

Stwierdzono również, że z zastosowanych odczynników DABA x 2HCl produkcji różnych firm (E. Merck, Darmstadt, Sigma Chem. Co-NoD-8251, Fluka A.C. - No 32780, Aldrich Chemicals No 11383-2, Eastman Organic Chemicals - No 3904), jedynie chlorowodorek kwasu 3,5-dwuaminobenzoesowego-Aldrich Chemicals można używać bezpośrednio do oznaczeń, natomiast produkty innych firm wymagają kilkakrotnego oczyszczania z węglem aktywnym lub krystalizacji.

LITERATURA

- [1] Burgi E., Hershey A. D., Biophys. J. 3, 309 (1963).
- [2] Burku H. J., Bunker S., Ritter M., Cleaver J. E., Radiat. Res. 62, 299 (1975).
- [3] Burku H. J., Moustacchi E., Radiat. Res. 71, 635 (1977).
- [4] Burku H. J., Roots R., Feinendegen L. B., Int. J. Radiat. Biol. 24, 363 (1975).
- [5] Chessin L. E., Borjeson J., Welsh P., Douglas S., Cooper H., J. Exp. Med. 124, 873 (1966).
- [6] Cattolico R. A., Gibbs S. P., Anal. Biochem. 69, 572 (1975).

- [7] Cleaver J. E., Burku H. J., Int. J. Radiat. Biol. 26, 399 (1974).
- [8] Cleaver J. E., Thomas G. H., Burku H. J., "Science" 177, 996 (1972).
- [9] Habener J. F., Bynum B. S., Shack J., Biochim. Biophys. Acta 204, 128 (1969).
- [10] Hoyer B. H., McCarthy B. J., Bolton E. T., "Science" 140, 1408 (1964).
- [11] Kapp Z. N., Brown S. Z., Klevecz R. H., Biochim. Biophys. Acta 361, 140 (1974).
- [12] Kissane J. M., Robins E. J., J. Biol. Chem. 233, 184 (1958).
- [13] Lisco H., Lisco E., Adelstein S. J., Banks H. H., Int. J. Radiat. Biol. 24, 45 (1973).
- [14] McGrath R. A., Williams R. W., "Nature" 219, 534 (1966).
- [15] Ono T., Okada S., Radiat. Res. 14, 204-207 (1973).
- [16] Peterson S., Bockrath R. C., J. Mol. Biol. 13, 600 (1965).
- [17] Robertson F. W., Tait K., Anal. Biochem. 41, 477 (1971).
- [18] Russev C. C., Tsanev R. G., Anal. Biochem. 54, 115 (1973).
- [19] Santoiani P., Ayala M., J. Inv. Derm. 45, 99 (1965).
- [20] Studier W., J. Mol. Biol. 11, 373 (1965).
- [21] Switzer B. R., Summer G. K., Clin. Chim. Acta, 32, 203 (1971).
- [22] Williams R. J., Little J. B., Shipley W. U., "Nature" 252, 754 (1974).

Maszynopis przyjęto do redakcji
20 IX 1978 r.

Zakład Biofizyki
Instytut Biochemii i Biofizyki UŁ

Błażej Różga, Aneta Koceva-Chyła, Elżbieta Poziomska

Tadeusz Tranda, Wanda Leyko

APPLICATION OF DABA · 2HCl TO A FLUORIMETRIC IDENTIFICATION
OF DNA FROM HUMAN LYMPHOCYTES IN ALKALINE SUCROSE DENSITY GRADIENT

The fluorimetric method with DABA · 2HCl was applied in the work in localizing the DNA in fractions of alkaline sucrose density gradient. The human

lymphocytes used in the experiments were excited towards the blastic transformation with phytohemagglutinine (PHA+), the unexcited human lymphocytes (PHA-) and the commercise sample of DNA izola ted from the calf thymus (Sigma Chem. Co) were also used. The obtained data show that the results of the fluorimetric assay of the human lymphocytes DNA using the DABA x 2HCl in the fractions of the sucrose density gradient are in agreement with results obtained using the radioizotope method; both for the unirradiated as well as for irradiated lymphocytes, and that this method might be used in the estimations of the molecular weight of the DNA using the centrifugation method in the sucrose density gradients without previous labelling of the cells.

Błażej Rózga, Aneta Koceva-Chyła, Elżbieta Poziomska

Tadeusz Tranda, Wanda Leyko

DIE ANWAENDUNG DER DABA • 2HCl ZUR FLUORYMETRISCHEN IDENTIFIZIERUNG

DER DNS DER MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN

IN ALKALISCHEN GRADIENT DER DICHTIGKEIT DER SACHAROSE

In der vorliegenden Arbeit verwendete man die fluorymetrischen Methoden aus DABA x 2HCl zur Bezeichnung der DNS-Lokalisierung in den Fraktionen des alkalischen Gradienten der Dichtigkeit der Sacharose. Man gebrauchte die menschlichen Lymphocyten, die zur blastischen Transformation mit Hilfe von Pito-hemaglutyninum (PHA+) angeregt wurden, die nicht angeregten menschlichen Lymphocyten (PHA-) und das gezüchtete Präparat der DNS des Kalbsthymus. (Sigma Chem. Co). Die gewonnen Angaben zeigten, dass die Ergebnisse der fluorymetrischen Kennzeichnung DNS der menschlichen Lymphocyten bei der Verwendung von DABA x 2HCl in den Fraktionen des alkalischen Gradienten der Dichtigkeit von Sacharose mit den Ergebnissen, die mit Hilfe der radioizotopischen Methode übereinstimmen, sowohl im Fall der bestrahlten Lymphocyten als auch der unbestrahlten. Diese Methode kann bei den Untersuchungen der Masse von Molekülen der DNS mit Hilfe des Wirbelins in den Gradienten der Dichtigkeit der Sacharose verwendet werden, ohne die Notwendigkeit der früheren Kennzeichnung der Zellen.

Die erwähnte Methode kann man als Lokalisierung der DNS auf der Lyse 10^4 der Lymphocyten bezeichnen.