

文章编号: 1007-4627(2005)02-0204-04

重离子诱导的质粒 DNA 双链断裂分布研究^{*}

王 潇¹, 马秋峰^{1,2}, 靳根明¹, 李文建¹, 张 红¹,
周利斌^{1,2}, 毛淑红^{1,2}, 邱 嵘¹, 刘 兵^{1,2}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 利用能量为 7.2 MeV/u 氦离子束辐照体外质粒 DNA: pUC18, 采用恒场凝胶电泳结合多功能荧光成像系统研究了 pUC18 双链断裂片段的分布。证实了双链断裂片段分布的非随机性, 结果还发现 DNA 断裂后片段的交联现象, 而且交联片段的分布也是非随机的。

关键词: 重离子; DNA 双链断裂; 非随机分布; 质粒 DNA

中图分类号: Q7 **文献标识码:** A

1 引言

随着人类探索太空活动的日趋频繁^[1]以及质子和重离子辐照治疗肿瘤的应用日益受到关注^[2,3], 重离子辐照哺乳动物细胞的生物学效应机理研究越来越受到重视。研究表明^[4-6], DNA 是电离辐射的关键靶, DNA 损伤势必改变和破坏细胞的遗传信息。作为辐射对活细胞作用的关键靶分子, DNA 的辐射损伤问题一直是分子放射生物学的中心课题。重离子辐射对 DNA 辐射损伤包括碱基缺失、糖变化、链断裂等, 其中 DNA 链断裂是极其重要的一种损伤。而 DNA 双链断裂 (DSB) 是电离辐射诱导的生物效应中最关键的原发损伤^[4], 因而成为辐射生物学研究的热点。

2 DNA 辐照敏感位点的研究

长期以来, 人们一直将 DNA 看成是均匀的, 其损伤与修复也是随机的^[5]。近年来的实验研究发现: 细胞内 DNA 的链断裂并不是随机的。最早用紫外线照射大肠杆菌 lacI 基因 117 bp 片段及 Al-*phoid* 序列 92 bp 长的 EcoRI 酶切片段时, 发现产生 TT 二聚体的难易程度与 DNA 的序列有关, 而且, 辐照完整细胞与辐照纯化的 DNA 结果一

致^[5]。γ 射线照射 φX174 DNA 诱导的单链断裂也是非随机分布的。另外, DNA 与蛋白质交联 (DPC) 的形成也不是随机的。对于 DSB, γ 射线照射 T₇ DNA, DSB 在 DNA 分子中的分布不是随机的^[6], 但是人们一直以为高 LET 的重离子诱导的 DSB 片段是随机分布的。

1996 年, 美国劳伦斯伯克利实验室的 Cooper 小组用高 LET 的重离子辐照细胞^[7,8], 首次观察到了细胞内的染色体 DNA 的 DSB 片段的非随机分布现象, 1997 年英国 Gray 实验室和德国 GSI 也报道了相似的研究结果。对于 DSB 非随机分布的解释, 因为 Cooper 等人的实验对象是完整细胞, 所以他们认为细胞中 DNA 所处的高度有序的染色体结构和入射粒子的电离特性起着极其重要的作用。目前, 国外的研究者在辐照哺乳动物完整细胞 DSB 的研究方面已经作了大量的工作。近年已有用脱蛋白的 DNA 做材料的报道, 虽然研究辐照细胞诱导的 DSB 比直接辐照 DNA 更切合实际, 但排除细胞组分的影响, 直接研究 DNA 的损伤可以得到更直观、更明确的结果。中科院近代物理研究所研究了碳离子直接辐照脱蛋白的哺乳动物细胞 DNA 样品诱导的 DSB^[9], 也发现了 DSB 非随机分布现象。由

收稿日期: 2004-05-24; 修改日期: 2004-07-13

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200070); 甘肃省科学基金资助项目 (ZS021-A25-009-Z); 中国科学院近代物理研究所长基金资助项目 (SZ030623)

作者简介: 王 潇 (1967-), 女 (汉族), 甘肃永登人, 理学博士, 副研究员, 从事辐射生物学及分子生物学研究;
E-mail: xiaowang@impcas.ac.cn

于是直接辐照 DNA, 得到了 DSB 片段的非随机分布的结果, 所以周光明等人的观点是: 重离子辐照所沉积的能量可以直接或间接地沿 DNA 链迁移, 从而导致链上相对较弱的或亲电性较高的化学键优先断裂, DSB 片段的非随机分布可能与 DNA 的序列有关, 即 DNA 分子上存在敏感位点^[9,10]。对于 DSB 非随机分布的现象, 国外学者称之为 DNA 的“簇损伤”, 有人认为 DNA 上存在辐照敏感性位点, 也有人称其为 DNA 辐射损伤“热点”^[11]。

国内外的生物学家在细胞基因组 DNA 方面做了大量研究, 但对质粒 DNA 的 DSB 分布情况还没人报道, 本文利用 Ne 离子辐照干燥的质粒 DNA, 采用恒场凝胶电泳对 DSB 片段的分布进行了研究。

3 材料与方 法

3.1 DNA 样品选取与制备

由于质粒 DNA 链短、体积较小, 而且物理图谱清晰, 因此本实验选择质粒 DNA pUC18(2.68 kbp)为辐照样品。本实验室建立了 pUC18 质粒转染的 E. coli JM109 细胞系。挑单克隆体培养于含氨卞青霉素的 LB 培养液中, 37 °C 振荡过夜。用碱裂解法抽提质粒 DNA(见参考文献[12])。抽提纯化后的质粒 DNA 溶入 PH 值 8.0 的 TE 缓冲液中, -20 °C 冻存备用。

3.2 靶样品的制备

由于束流的能量相对较低(7.199 MeV/u ²⁰Ne⁷⁺), 为了使束流穿透靶实现剂量的检测, 我们选了 8 μm 厚的铝箔做靶衬底。由于铝箔表面是光滑的, 要使在缓冲液中 DNA 克服分子张力, 均匀地铺在铝箔上, 制靶采用特殊的工艺。

辐照靶样品的制备如下: 将 8 μm 厚的铝箔用 1.0% 的 SDS 煮沸清洗三次(每次煮沸不少于 30 min), 再用去离子水清洗, 晾干后涂上一层含 1% 甘油的聚乙烯醇缩醛, 制成 φ8 mm 的圆片过夜晾干以备做 DNA 的衬底。将 20 μL 的质粒 DNA 铺在靶中间, 在超净工作台上过夜晾干以备辐照用。辐照后把每个铝膜片上的 DNA 用 20 μL 的 TE 缓冲液洗脱收集, 置入 -20 °C 冻存, 以备分析。

3.3 辐照

用兰州重离子研究装置提供的 7.199 MeV/u

²⁰Ne⁷⁺, 在真空靶室里辐照样品靶。分 10, 40, 100, 400, 1 000, 3 000, 6 000 和 10 000 Gy 8 个剂量点照射, 每个剂量点 3 个平行样, 对照样也分 3 组平行样, 对照样除了没有辐照外, 其处理过程都与辐照的样品相同。

3.4 DNA 损伤的测量

将辐照过的 DNA 样品室温加到 0.8% 的琼脂糖凝胶中, 加 1×TBE 缓冲液(0.1 mol/L Tris, 0.083 mol/L 硼酸, 1 mmol/L EDTA)使电极液高出胶面约 1 cm, 在 5 V/cm 恒电场下电泳 90 min, 将凝胶放入 0.5 mg/mL 的溴化乙锭中染色 30 min。然后将染色后的琼脂胶放入 Line Analytics LTD 的多功能成像系统中进行荧光成像分析。

4 结果与分析

电泳发现辐照后的样品 DSB 片段呈现非随机的团簇状分布, 而且还发现了 DNA 的交联现象, 以及交联片段的分布也是非随机的。图 1 给出了一例有代表性的电泳结果。图中第 1—5 分别是 10, 40, 100, 400 和 1 000 Gy 的剂量; 7—10 泳道分别是 1 000, 3 000, 6 000 和 10 000 Gy 的剂量; 第 6 泳道是 LambdaDNA/Hind III+EcoRI Marker; 第 11 泳道是对照质粒 DNA 样品。对照样有 3 条带, 1 号带是超螺旋环状(SC 型)质粒 DNA 带, 2 号带是线状(LI 型)带, 3 号带是开口环状(OC 型)带, 1 号带占 80% 以上, 且几乎不含有 2 号带, 这证明材料是可靠的。1—4 泳道辐照剂量较小, 与 11 泳道的对照样相比, 线状(LI 型)带含量逐渐增大, 超螺旋带和开口环状带略微变“胖”。5, 7, 8, 9 和 10 泳道除了 1 号(SC 型)、2 号(LI 型)和 3 号(OC 型)带外, 在分子量约 4 300 bp 处出现了一条 4 号带; 8, 9 和 10 泳道在分子量约为 21 200 bp 处多出了一条 5 号带; 8 和 10 两个泳道在分子量更高处分别多出两条带(6 号带和 7 号带), 4, 5, 6 和 7 号带为 DNA 交联带, 而且呈弥散分布, 并且两泳道在小于 150 bp 处均出现了一个典型的团簇(8 号带)。4, 5, 6 和 7 号带与对照样比为分子量增大的带, 推测是由于辐照剂量增大, 容易使干燥的 DNA 产生相互交联, 而且交联也呈团簇状分布, 即非随机分布。8 和 10 泳道的带形均有所变“胖”, 推测为 DNA 分子的化学结构发生了变化, 致使 DNA

结合溴化乙锭的能力增强，从而造成荧光增强。

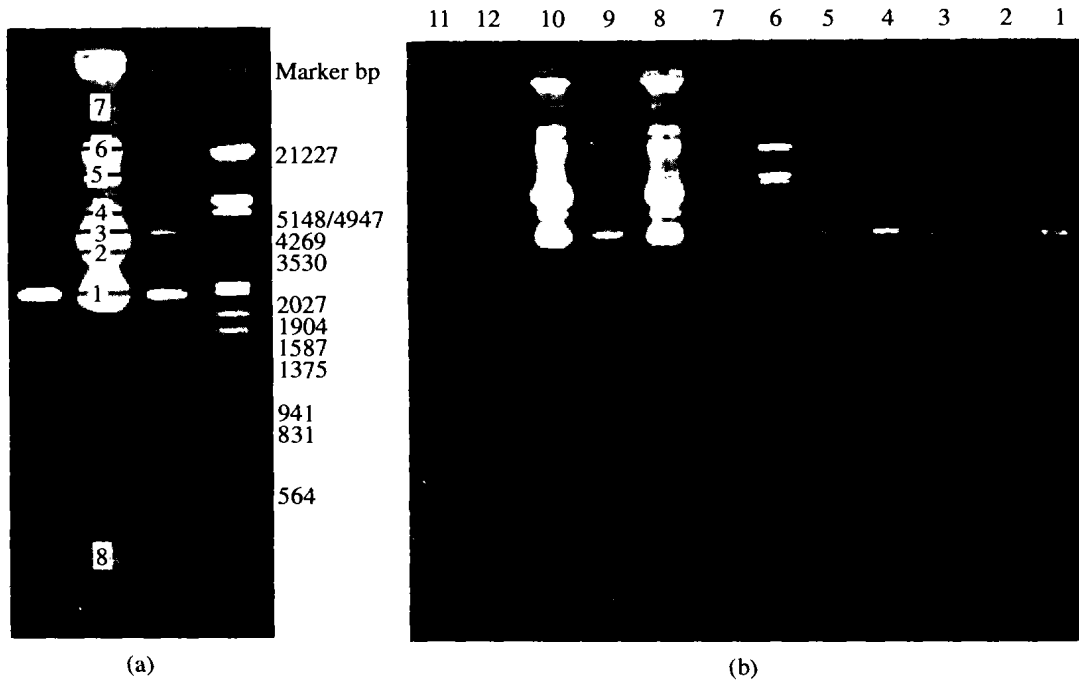


图 1 (a) 带号参照及 Marker 分子量。(b) 7.199 MeV/u ²⁰Ne⁷⁺ 辐照引起 pUC18 DNA 链断裂分布(1)10, (2)40, (3)100, (4)400, (5)1 000, (6)Marker, (7)1 000, (8)3 000, (9)6 000, (10)10 000 和 (11) 0 Gy, (12)空样品

经过重离子照射，本实验发现了干燥 DNA 的 DSB 非随机分布，此前，国内外未见报道。至此，用高 LET 的重离子照射研究发现，细胞内染色体 DNA、脱蛋白的核 DNA、细胞内线粒体 DNA 和体外质粒 DNA 等的 DSB 都出现了非随机分布现象。但是目前对 DNA DSB 非随机分布现象没有统一的解释，DNA 簇损伤是辐射所致细胞死亡或突变的关键损伤，但因检测方法跟不上，因而对它的发生率、可修复性及生物学后果仍不甚了解，甚至在概

念上时有模糊(如：DSB 是簇损伤 2 个或多个损伤的范围多大?)^[13]。基于簇损伤的重要性和复杂性，Pinto M 2001 年在法国举行的“DNA 辐射损伤国际讨论会”上指出：未来实验研究应着重 DNA 簇损伤测定和特性的揭示。我们对 DNA 非随机损伤的研究工作仍在继续，下一步将使用更先进的检测手段如基因芯片等，找出敏感热点的序列特征。同时我们也在模拟计算上取得初步进展。

参 考 文 献:

[1] 杨垂绪, 梅曼彤. 空间辐射生物学. 广州: 中山大学出版社, 1995. 9.

[2] 卫增泉. 原子核物理评论, 1997, **14**(2): 102.

[3] Kraft G. Progress Particle Nucl Phys. 2000, **45** (Supple 2): S473.

[4] Rydberg B, Lohrich M, Cooper P K. Radiat Res. 1994, **139**: 133.

[5] 夏寿萱主编. 放射生物学. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 78—79.

[6] Friedberg E C. DNA Repair. New York: Academic Press, 1985, 141—212.

[7] Bjorn Rydberg. Radiation Research, 1996, **145**: 200.

[8] Lohrich M, Cooper P K, Rydberg B. Int J Radiat Biol, 1996, **70**: 493.

[9] 周光明, 李文建, 王菊芳等. 生物物理学报, 2000, **16**(1): 139.

[10] 周光明, 李文建, 高清祥等. 原子核物理评论, 2003, **20**(1): 52.

[11] 夏 璐, 丘冠英, 夏寿萱. 国外医学·放射医学核医学分册, 1997, **21**: 30.

- [12] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿迪斯(美). 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1999, 19—22.
- [13] 丘冠英. 国外医学·放射医学核医学分册, 2002, 26(4): 145.

Study on Plasmid DNA Damage Induced by Low-energy Neon Ion Irradiation^{*}

WANG Xiao¹, MA Qiu-feng^{1,2}, JIN Gen-ming¹, LI Wen-jain¹, ZHANG Hong¹,
ZHOU Li-bin^{1,2}, MAO Shu-hong^{1,2}, QIU Rong¹, LIU Bing^{1,2}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*
Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: DNA is considered to be the most important and sensitive target in biological systems. In addition to the base damage, DNA strand breaks are the major lesion in the genome due to exposure to ionizing radiation. Mutation can be introduced to DNA as a result of enzymatic processing of DNA lesions or post-irradiation replication. However, the mechanisms of radiation-induced mutations are not well clarified at the molecular level. To study the effect on the simple plasmid DNA of heavy ion is even predominant or more feasible.

Plasmid pUC18 DNA was prepared and irradiated by neon beam (7.199 MeV/u). The fragment distributions were determined by quantifying the ethidium bromide fluorescence. It can be seen that the shape of the intensity distributions is vastly different for the used radiation Dose. The distribution produced shows an excess of fragments particularly in 3 000 and 10 000 Gy the size range between 20—40 kbp and 20—50 bp. This clustering of double-stranded fragments might be influenced by the higher order chromatin structure of genomic DNA. If so, DNA loop structures could correspond to the size range for which we observed DSB clustering. Further studies aim at elucidating the heterogeneity of DSB induction within the genome and investigate the influence of chromatin structure on the non-random fragment distribution.

Key words: heavy ions; DNA double-strand break; non-random distribution; plasmid DNA

^{*} **Foundation item:** National Natural Science Foundation for Young Scholar(30200070); Science Foundation of Gansu Province (ZS021-A25-009-Z); President Foundation of Institute of Modern Physics of Chinese Academy of Sciences (SZ030623)