

文章编号: 1007-4627(2003)01-0052-03

DNA 双链断裂产额的新算法*

周光明¹, 李文建¹, 高清祥², 卫增泉¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: DNA 双链断裂(DSB)的定量分析是高传能线密度辐射生物学效应机理研究的重要手段。从实际应用出发, 推导了一个新的计算公式——平均分子量法。该法不探究 DSB 片段的具体分布模式, 实际操作中却又包含了片段的含量和分布; 而且形式简单、操作简便, 尤其适合于荧光扫描数据。

关键词: DNA 双链断裂; 高传能线密度辐照; 生物学效应; 计算方法

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

随着质子和重离子辐照治疗肿瘤的应用日益为人们接受, 高传能线密度(LET)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。由于 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^[1], 因而成为辐射生物学的热点。对于哺乳动物细胞染色体大小的 DNA 来说, DNA 片段的分离和定量是首要问题。脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)的发明大大提高了分析的灵敏度^[2], 对电泳数据的处理, 即 DNA 断裂水平(L)的计算, 尤为关键。

2 常用的计算公式

有关 L 的计算公式有很多报道, 由于人们一直以为 DSB 片段的分布是随机的, 因而早期的 DSB 产额计算大多按照随机分布模型由 DNA 片段释放百分比(PR)计算得到。Cedervall 等^[3]开发了特定大小标记物法、片段大小分布法、分子量分布状态法和 PR 校正法。其中片段大小分布法最好, 对高剂量和低剂量辐照都适用, 其公式如下:

$$Q = 1 - e^{-LX_M} \left(1 + LX_M \left(1 - \frac{X_M}{S} \right) \right), \quad (1)$$

其中, Q 为小于大小为 X_M 的 DNA 的百分比, S 为染色体的平均大小。用最小二乘法求断裂水平 L。

但 1996 年美、英、中等国先后发现高 LET 辐照诱导的 DSB 片段的非随机分布现象^[4-6], 从而动摇了片段大小分布法的应用基础。

另一个有代表性的计算公式是 Sutherland 等^[7]于 1996 年发表的 Moment 法, 它不探究 DSB 片段分布的具体模式, 但在计算过程中综合考虑不同片段的大小及其含量, 因而适用于任何分布模式的 DSB 产额的计算。其计算公式为

$$L_n^{-1} = \frac{\int \frac{\rho(x) dx}{L(x)}}{\int \rho(x) dx}, \quad (2)$$

其中, L_n^{-1} 为平均分子量的倒数, 相当于 DNA 断裂水平 L, 下角 n 表示凝胶泳道中任意的一段; $L(x)$ 为电泳泳道上 x 位置处的 DNA 片段长度; $\rho(x)$ 为 x 位置处的荧光强度。 L_n^{-1} 对剂量作图, 可以由直线的斜率得到 DSB 的产额。

在不探究 DSB 片段分布的具体模式时, 难于确定每一条泳道上 DNA 荧光强度的分布函数, 积分也就相当困难。实际操作时是将每一条泳道均分为若干段, 用每一段凝胶块中 DNA 荧光强度和平均分子量的商求和得到 L_n^{-1} ^[8]。虽然 Moment 法在

收稿日期: 2002 - 09 - 17; 修改日期: 2002 - 11 - 04

* 基金项目: 中国科学院西部之光课题(XB980604)

作者简介: 周光明(1970-), 男(汉族), 湖北枝江人, 助理研究员, 从事辐射生物学效应及其机理研究。

原理上比片段大小分布法更合理,但在实际操作时有很大的缺点.由于一条泳道一般要均分为 100 多个等长的凝胶块,每块都要分别测荧光(或放射性)强度、计算片段的平均分子量,工作繁琐、劳动强度大,而且长时间在紫外线下工作对实验人员的眼睛损伤很大.所以,推导一个合理、实用的计算方法迫在眉睫.

3 平均分子量法

假设一个哺乳动物细胞中有 m 条线状双链 DNA 分子,总长为 X/Mbp ,Mbp 是兆碱基对.辐照后产生的 DNA 片段百分比为 PR ,DSB 片段平均大小为 T/Mbp ,则 DNA 片段数为 $(X \times PR)/T$.另外,可以将细胞中的 m 条线性 DNA 看作是一个细胞中已经存在了 m 条 DSB 片段,那么,辐照产生 1 个 DSB, DNA 片段就增加为 $m+1$ 条,产生 n 个 DSB 就增加为 $m+n$ 条.因此,辐照诱导的 DSB 数目 $n=(X \times PR)/T-m$,则断裂水平为

$$L = \left(\frac{X \times PR}{T} - m \right) \div X = \frac{PR}{T} - \frac{m}{X}. \quad (3)$$

每个哺乳动物细胞的 DNA 含量约为 6 000 Mbp,而染色体数目一般不超过 50 条, DNA 分子少于 100,即 $(m/X) < 0.02$,因此可以忽略,将计算公式简化为 $L=(PR)/T$,其中, L 的单位为 DSBs/Mbp.

在理论上,一个细胞的 DNA 断裂水平与样品中的总 DNA 断裂水平是一致的. PR 可以根据荧光扫描数据得到;从参考分子量标准可以得到各片段峰的分子量,各片段峰的 DNA 相对含量与分子量加权平均求得 DSB 片段的平均分子量 T . L 与辐照剂量 D 为线性关系,由直线的斜率得出 DSB 的产额.因为本计算方法的核心在于计算 DSB 片段的平均分子量,所以将此计算方法称作为平均分子量法.

4 应用举例

采用 $102.0 \text{ keV}/\mu\text{m}$ 的 $^{16}\text{O}^{8+}$ 分别辐照 B16 细胞及其 DNA 分子,然后用 PFGE 和荧光扫描进行定量分析.图 1 是平均分子量法计算结果(b)与片段大小分布法计算结果(a)的比较.很明显,片段分布法得到的结果与剂量之间的线性关系很差;而平

均分子量法计算得到的结果在 80 Gy 以内与剂量存在很好的线性关系,细胞样品的回归系数 $r=0.97$; DNA 样品的回归系数 $r=0.98$.剂量超过 80 Gy 以后, DNA 断裂水平 L 反而下降,可能是由于剂量过大,导致 DNA 分子之间发生了交联^[9].

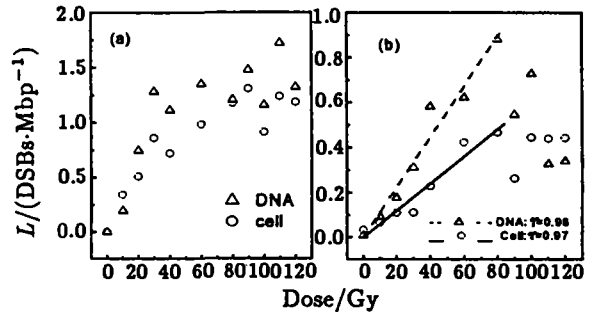


图 1 $102 \text{ keV}/\mu\text{m}$ $^{16}\text{O}^{8+}$ 引起的 DNA 断裂水平的片段大小分布法 (a) 以及本文建议的方法平均分子量法 (b) 结果比较

同样,如图 2 所示,采用 $35.5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照 B16 细胞的 DNA 分子得到的结果也表明,我们提出的平均分子量法的计算结果比片段大小分布法更为理想,前者与剂量的线性回归系数高达 0.99,而后者只有 0.90.

不难看出,我们推导的平均分子量法的计算结果更为可靠.

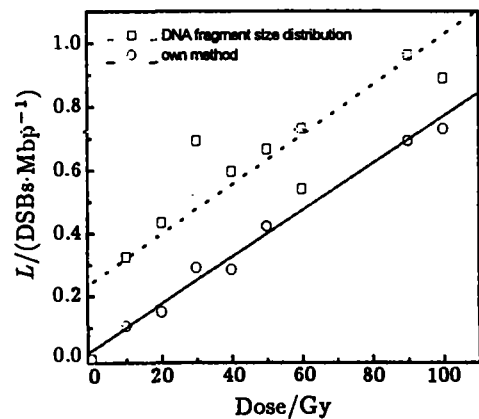


图 2 $102 \text{ keV}/\mu\text{m}$ $^{12}\text{C}^{6+}$ 引起的 DNA 断裂水平和 DNA 片段大小分布分析以及本文建议的方法

5 结束语

在形式上,平均分子量法十分简单.在原理上,与 Moment 法有相似,它不探究 DSB 片段分布的具体模式,但计算时又充分体现了片段的分布,因此更合理,适用范围也更广泛,对于 DSB 片段随机

分布和非随机分布的情况都适用。在实际操作上,更为可行,计算也大大简化,对于荧光扫描结果的处理尤为方便。从运算结果来看,平均分子量法得到的 L 值与剂量的相关性很好,优于片段大小分布法。但此算法只适于辐照剂量不是很高的情况。

致谢 李强、王菊芳、党秉荣、郝冀方、马秋峰、何静、冯岩和邱丽梅等人在样品辐照与处理过程中给予了大力协助,感谢兰州大学李海燕老师对样品进行了荧光扫描。

参 考 文 献:

- [1] Rydberg B, Lobrich M, Cooper P K. DNA Double-strand Breaks Induced by High-energy Neon and Iron Ions In Human Fibroblasts I Pulsed-field Gel Electrophoresis Method [J]. *Radiat Res*, 1994, **139**, 133.
- [2] 夏璐, 丘冠英. DNA 链断裂检测技术的进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24**(1): 31.
- [3] Cedervall B, Wong R, Albright N, *et al.* Methods for the Quantification of DNA Double-strand Breaks Determined from the Distribution of DNA Fragment Sizes Measured by Pulsed-field Gel Electrophoresis [J]. *Radiat Res*, 1995, **143**, 8.
- [4] Löbrich M, Cooper P K, Rydberg B. Non-random Distribution of DNA Double-strand Breaks Induced by Particle Irradiation [J]. *Int J radiat Biol*, 1996, **70**, 493.
- [5] Newman H C, Prise K M, Folkard M, *et al.* DNA Double-strand Break Distributions in X-ray and α -particles Irradiated V79 Cells; Evidence for non-random breakage [J]. *Int J Radiat Biol*, 1997, **71**(4): 347.
- [6] Wei Z Q, Zhou G M, Wang J F, *et al.* Carbon Ion Induced DNA Double-strand Breaks in Melanophore B16 [A]. In: Kraft G and Langbein K ed. 6th Workshop on Heavy-charged Particles in Biology and Medicine[C]. GSI Report 97-09. Germany: Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH, 1997, A7.
- [7] Sutherland B M, Bennett P V, Sutherland J C. Double Strand Breaks Induced by Low Doses of γ rays or Heavy Ions; Quantitation in nonradioactive human DNA [J]. *Anal Biochem*, 1996, **239**, 53.
- [8] Höglund E, Stenerlöw B, Carlsson J, *et al.* Initial DNA Fragmentation Induced by Radiation of Different Linear Energy Transfer[A]. 6th Workshop on Heavy-charged Particles in Biology and Medicine [C]. GSI Report 97-09. Germany: Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH, 1997, A8.
- [9] Wlodek D, Banath J, Olive P. Comparison between Pulsed-field and Constant-field Gel Electrophoresis for Measurement of DNA Double-strand Breaks in Irradiated Chinese Hamster Ovary Cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 1991, **60**, 779.

A New Method for Calculating Yield of DNA Double-strand Breaks*

ZHOU Guang-ming¹, LI Wen-jian¹, GAO Qing-xiang², WEI Zeng-quan¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*;

2 *School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*)

Abstract: Quantitative analysis of DNA double-strand break (DSB) is of importance for studying on the mechanisms of radiobiological effects induced by high linear energy transfer (LET) irradiation. For the practical use, one new calculating formula named the method of average molecular weight is deduced. In this method, the factual distribution of DSB fragments is not considered, but actually, the content and distribution of DSB fragments are included. Totally, this method is simple in shape and easy to use, especially for the data obtained from fluorescence scanning.

Key words: DNA double-strand break; high linear energy transfer irradiation; biological effect; calculating method

* **Foundation item:** Western Light Program of Chinese Academy of Sciences (XB980604)