

# $^7\text{Li}$ 和 $^{12}\text{C}$ 离子致 DNA 链断裂的研究\*

隋丽<sup>1;1)</sup> 赵葵<sup>1,2</sup> 倪帽楠<sup>1</sup> 郭继宇<sup>1</sup> 罗红兵<sup>1,3</sup> 梅俊平<sup>1,4</sup> 路秀琴<sup>1</sup> 周平<sup>1</sup>

1(中国原子能科学研究院 北京 102413)

2(北京师范大学射线束技术与材料改性教育部重点实验室 北京 100875)

3(湖南农业大学农学院 长沙 410128)

4(河北工业大学 天津 300130)

**摘要** 选用 HI-13 串列加速器产生的不同传能线密度的  $^7\text{Li}$  和  $^{12}\text{C}$  重离子,以不同的剂量对纯化的质粒 DNA 水溶液进行了辐照.利用原子力显微镜对这两种重离子诱发的 DNA 损伤进行了纳米水平的结构分析,并用 Scion Image 分析软件完成了 DNA 碎片长度的测量.得到了 DNA 分子超螺旋、开环和线性三种形态随剂量的变化情况以及 DNA 碎片长度的分布函数,并用 Tsallis 熵统计理论对实验结果进行了拟合.

**关键词** 重离子 双链断裂 传能线密度 原子力显微镜 质粒 DNA

## 1 引言

脱氧核糖核酸(DNA)是生物体中一类最基本的大分子,是遗传信息的载体<sup>[1]</sup>.在辐射生物学和放射医学中,DNA 是电离辐射引致细胞杀伤或转化的主要靶分子.损伤类型包括:碱基损伤、糖基损伤、单链或双链断裂以及 DNA 交联等.双链断裂(DSB)是辐射所致生物效应中最重要的原初损伤<sup>[2-5]</sup>.

此实验旨在研究重离子诱发的 DNA 双链断裂.这是因为重离子具有高传能线密度(LET)的特点,其辐射所引起的能量沉积密集,局部剂量大.已有的实验结果表明,与低 LET 辐射相比,具有高 LET 辐射的重离子能诱发 DNA 分子中出现更多的非重接性链断裂,更有效的杀伤细胞,诱发突变<sup>[2]</sup>.但对它的研究远远少于对电子、光子等辐射效应的研究.

国内外研究 DNA 双链断裂的方法很多,其中原子力显微镜(AFM)技术是一种新型的研究方法.它能在纳米级分辨下观察物质结构,可广泛地应用于有机分子和生物材料等研究领域.特别是它能在自然生理环境下(空气或水溶液中)观察生物样品,且

样品制备简单.AFM 显微技术是在分子水平上研究辐射所致 DNA 结构和功能变化的有力工具.与传统的凝胶电泳技术相比,它能区分 DNA 分子的各种形态,并能实现对辐照诱发的 DNA 较小碎片的测量,有效地避免了对辐射诱发的 DNA 断裂碎片的低估.

但是,迄今为止,在用 AFM 观测电离辐射致 DNA 链断裂的仅有的几个实验研究中,所用的电离辐射源为电子、X 射线、 $\gamma$  射线和  $\alpha$  粒子<sup>[6-9]</sup>.还未见用 AFM 直接观测重离子引起的 DNA 双链断裂研究的正式报道.

因此,通过使用 AFM 技术来研究重离子诱发的 DNA 双链断裂,可实现在分子水平上更好的研究电离辐射所诱发的 DNA 损伤的机制,从而为高 LET 辐射情况下人类健康的危险性评估提供生物学上的依据,并做出相应防护.

## 2 材料与方法

### 2.1 实验用 DNA 样品及制备

使用大肠杆菌的 pGEM-T1 质粒 DNA,平均长度

2003-12-31 收稿

\* 国家自然科学基金(10175095)资助

1) E-mail: lisui@iris.ciae.ac.cn

为 3545bp, 样品形态为超螺旋(约占 80%)及开环, 原始浓度为 250ng/ $\mu$ L, 由军事医学科学院放射医学研究所放射毒理实验室构建. 制备方法是在 pGEM-T Easy 克隆载体(Promega 公司生产)中插入一段 527bp 的 DNA 修复基因 XRCC-1 片段. 重组质粒转化大肠杆菌 TOP 10F', 采用 Wizard Plus SV Miniprep 质粒 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司产品)提取纯化质粒 DNA, DNA 溶于消毒三蒸水中.

## 2.2 <sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 重离子对 DNA 样品的辐照

分别选用中国原子能科学研究院 HI-13 串列加速器产生的 26MeV 的<sup>7</sup>Li 和 84MeV 的<sup>12</sup>C 离子对 DNA 水溶液进行辐照. 辐照是在加速器的扫描管道上进行的, 被加速的重离子, 以法线方向自真空管道透过 25 $\mu$ m 厚的 Kapton 薄膜、1.5cm 的空气层和 2.5 $\mu$ m 的 Mylar 膜之后, 到达 DNA 样品表面, 在大气状态下对 DNA 样品进行辐照. 在样品表面, 不同重离子相应的物理参数(在水中)如表 1 所示. 在辐照的同时, 选用金硅面垒半导体探测器来监测入射粒子数, 以得到相应的粒子流量和剂量. 实验中 DNA 样品所受的剂量依次为 1, 2, 4, 6, 8 和 10Gy. 在辐照过程中, DNA 溶液均被放置于一个特制的固定装置中, 辐照完成之后, 将辐照好的 DNA 溶液从固定装置中取出, 移入微量离心试管, 保存于冰箱中待用.

表 1 重离子种类及相应物理参数

重离子种类	束流能量/ MeV	在样品表面的 能量/MeV	LET/ (keV $\cdot\mu$ m <sup>-1</sup> )	射程/ $\mu$ m
<sup>7</sup> Li	26	18	124	91
<sup>12</sup> C	84	73	242	186

## 2.3 AFM 成像及 DNA 碎片长度测量

在室温下, 分别将未辐照的对照 DNA 样品和不同剂量辐照后 DNA 样品用去离子重蒸水稀释至 10ng/ $\mu$ L. 然后, 取出 5 $\mu$ L 吸附于 APTES-云母表面. 几分钟后, 取少量重蒸水将吸附有 DNA 的云母表面冲洗若干次, 以便冲洗掉多余的污染物及未吸附的 DNA 分子. 最后, 将冲洗后的云母置于阴凉干燥处自然风干. 至此, 供 AFM 观测的 DNA 样品的制备完毕.

在室温下, 大气环境中, 使用国产 AJ-III 型 AFM (上海爱建纳米科技发展有限公司生产)的轻敲模式对 DNA 样品进行成像, 所用 AFM 探针为俄罗斯产 NSC11/50 系列轻敲式探针, 针尖的曲率半径小于 10nm, 悬臂的弹性系数为 23—91N/m. 图像的扫描频

率为 1Hz, 采样点为 512 $\times$ 512.

通过使用 Scion Image 分析软件来进行 DNA 碎片长度的测量. 此分析软件中的分段测量方法可在纳米水平分辨上对曲线片段进行测量. 这样便可实现对不同形态 DNA 碎片长度的定量测量. 为了得到具有统计意义的 DNA 碎片长度分布函数, 对于每个剂量点选取 100 个 DNA 分子进行测量(这样所引入的统计误差为 10%).

## 3 结果与讨论

### 3.1 <sup>7</sup>Li 离子辐照后的实验结果

使用 AJ-III 型 AFM 对不同剂量的 Li 离子辐照之后的 DNA 样品进行了观测, 仅给出一些较为典型的图像. 如图 1(a, b) 所示, 分别是所受剂量为 4Gy 和 10Gy 的 DNA 样品的 AFM 图像. 由图 1(a) 可以看到, 经 4Gy 剂量辐照之后的 DNA 分子呈现 3 种形态: 超螺旋(SC, 完整 DNA)、开环(OC, 单链断裂的 DNA)和线性(L, 双链断裂的 DNA), 其中线性 DNA 分子还包括一些较短的 DNA 碎片. 由图 1(b) 看到, 受 10Gy 剂量辐照之后的 DNA 分子多呈现为 L 形态.

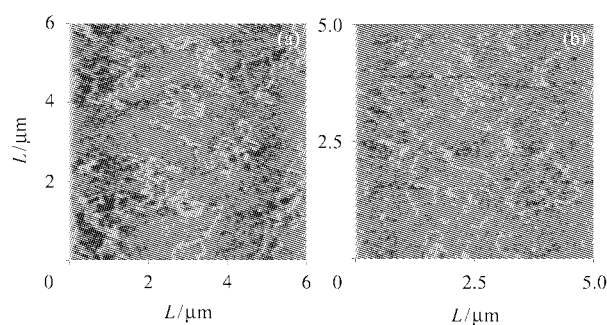


图 1 <sup>7</sup>Li 离子辐照之后 DNA 分子的 AFM 图像  
详细说明见正文.

通过大量 AFM 观测, 对不同剂量辐照后的 DNA 样品中 3 种分子形态所占的比例进行了估算, 结果如图 2 所示. 由图可以看到, 随着剂量的增加, SC 形态的 DNA 分子逐渐减少, L 形态的 DNA 分子逐渐增加, 直到分子形态几乎全部呈现 L 型. 这些 L 型 DNA 分子的来源有两种途径: 一是直接由 SC 型 DNA 分子发生双链断裂转变而来; 二是由 OC 型 DNA 分子发生单链或双链断裂转变而来. 因此, 用 L 型 DNA 分子来估计 DNA 双链断裂的频率往往比实际偏高.

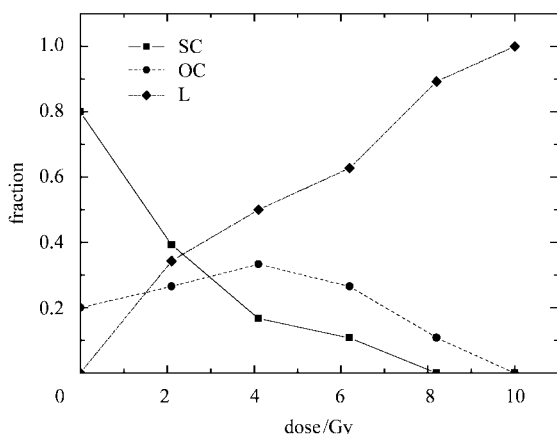


图 2  ${}^7\text{Li}$  离子辐照后 DNA 分子 3 种形态所占比例与剂量的关系  
详细说明见正文.

利用 Scion Image 分析软件中的分段测量方法, 对不同剂量  ${}^7\text{Li}$  离子辐照后的 DNA 样品中的链长度进行了统计测量, 得到了样品中 DNA 碎片长度的分布, 如图 3 所示. 其中图 3(a—e) 分别是经 2, 4, 6, 8

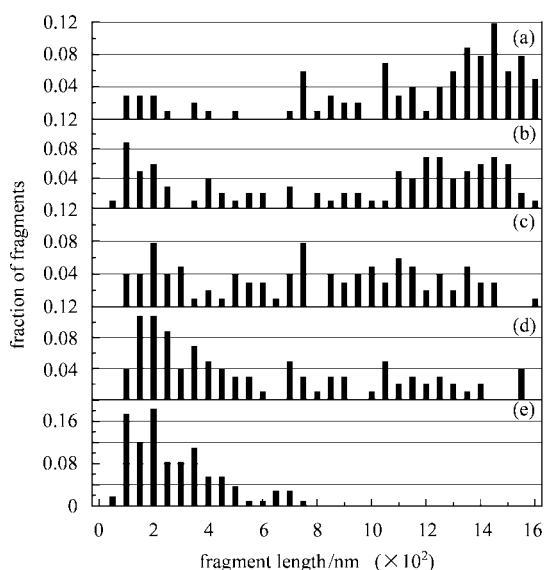


图 3  ${}^7\text{Li}$  离子辐照后 DNA 样品中碎片的长度分布  
详细说明见正文.

和 10Gy 剂量辐照. 由图可以看到, 随着剂量的增加, 样品中的 DNA 碎片越来越短, 当剂量达到 10Gy 时, 碎片的长度只在 0—750nm 之间分布. 与文献[8]中使用 AFM 技术得到的结果相比, 大于 8.3kGy 的  $\gamma$  射线所诱发的断裂. 因此, 具有高 LET 值的  ${}^7\text{Li}$  离子与低 LET 射线相比, 能够更为有效地引起 DNA 链的

断裂. 而且, 从图中还可以看到, 随着剂量的增加, 短碎片区域出现了明显的峰, 这一现象有力的支持了高 LET 辐射可以使双链断裂的分布更局部和更密集假设. 在测量过程中还看到, 线性形态的 DNA 分子的长度也在逐渐变短, 这可能是复杂 DNA 损伤 (即在同一个 DNA 分子上发生了 DNA 单链断裂、DNA 双链断裂或 DNA 碱基损伤等多重损伤) 引起 DNA 分子二级结构被破坏的结果. 由测量结果还可看出, 测量得到的完整 DNA 分子的长度大于 DNA 分子的实际长度, 这是由于 AJ-III 型 AFM 的扫描管存在刻度与非线性问题, 以及测量过程中存在测量误差. 此外, 由于 AJ-III 型 AFM 的分辨率不是太好, 在测量过程中可能会将一些很短的 DNA 碎片丢失, 从而引起对 DNA 小碎片的低估. 因此, 为了得到更为精确的测量结果, 计划在进口 Nanoscope IIIa 型 AFM 上继续进行观测和测量.

### 3.2 ${}^{12}\text{C}$ 离子辐照后的实验结果

使用 AJ-III 型 AFM 对  ${}^{12}\text{C}$  离子辐照后的 DNA 样品也进行了观测. 图 4(a, b) 为经 1Gy 和 8Gy 剂量辐照后的 DNA 样品的 AFM 图像. 通过对这些经不同剂量辐照之后的 DNA 样品的大量测量, 结果表明,  ${}^{12}\text{C}$  离子辐照后的 DNA 样品中 DNA 分子形态的变化趋势与  ${}^7\text{Li}$  离子辐照后的基本相似, 即随着剂量的增加, SC 形态的 DNA 分子越来越少, L 形态的 DNA 分子越来越多. 以受 8Gy 剂量辐照后的 DNA 样品为例, AFM 测量结果表明, 辐照之后, 样品中 SC 形态的 DNA 分子所占的比例只有 3.2%, OC 形态的 DNA 分子占 13.7%, 而 L 形态的 DNA 分子所占的比例则达到了 83.1%.

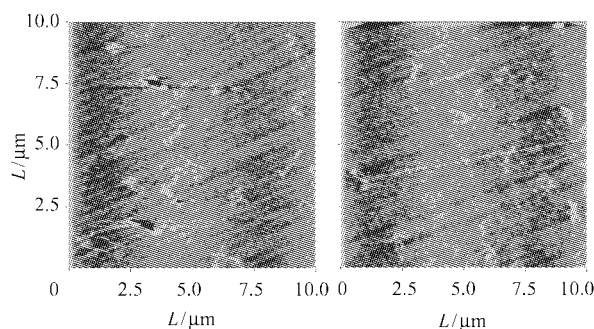


图 4  ${}^{12}\text{C}$  离子辐照之后的 DNA 分子的 AFM 图像  
详细说明见正文.

为了进一步了解不同 LET 值的重离子辐照对

DNA 链断裂的影响,对剂量为 8Gy 的<sup>12</sup>C 离子辐照后 DNA 样品中的碎片长度进行了测量,得到了如图 5 所示的长度分布,并与相同剂量的<sup>7</sup>Li 离子辐照后的 DNA 碎片的长度分布进行了比较.结果表明,在相同的剂量下,<sup>12</sup>C 离子辐照产生的 DNA 短碎片(50—150nm)要比<sup>7</sup>Li 离子的多得多.这说明,LET 值为 242keV/ $\mu$ m 的<sup>12</sup>C 离子比 124keV/ $\mu$ m 的<sup>7</sup>Li 离子具有更强的诱发双链断裂的能力.

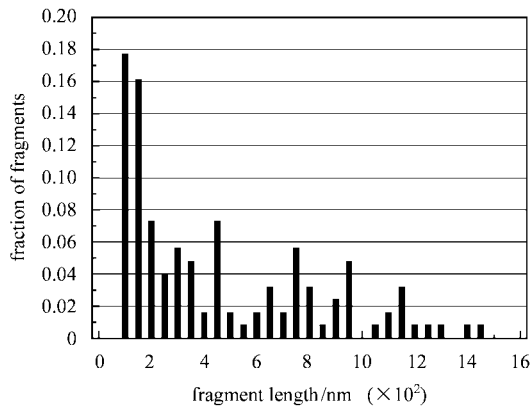


图 5 经 8Gy 的<sup>12</sup>C 离子辐照后 DNA 样品中碎片的长度分布

### 3.3 借用 DNA 双链断裂统计模型 Tsallis 熵拟合实验结果

任何一个统计分布都可以由熵的极大值得到.如果从 Boltzmann-Gibbs 熵出发,可以得到 DNA 双链断裂的随机断裂模型的结果.由于 DNA 的双链断裂在空间上是有关联的,因此经典的 Boltzmann-Gibbs 熵是不适用的.因此,可用 Tsallis 熵来研究这种带有有关联的 DNA 双链断裂<sup>[10,11]</sup>.利用 Tsallis 熵宏观统计理论推导出的 DNA 双链断裂的分布函数为

$$p(l) = \frac{\beta(2-q)}{[1 + \beta(q-1)l]^{\frac{1}{q-1}}},$$

其中  $\beta$  为拉格朗日乘子,  $q$  为实数.利用上式对 AFM 观测得到的 8Gy 的<sup>7</sup>Li 离子和<sup>12</sup>C 离子的实验数据进行了拟合.拟合结果见图 6.可以看到, Tsallis 熵计算与实验得到的 DNA 碎片长度分布拟合得很好.计算中,  $1 < q < 2$ , 这两组拟合较好的结果所取的  $q$  值均接近于 2, 说明重离子诱发的 DNA 双链断裂在空间上有较强的关联.但由于只是一些初步的结果,参数

$\beta$  和  $q$  的物理意义有待进一步搞清楚.

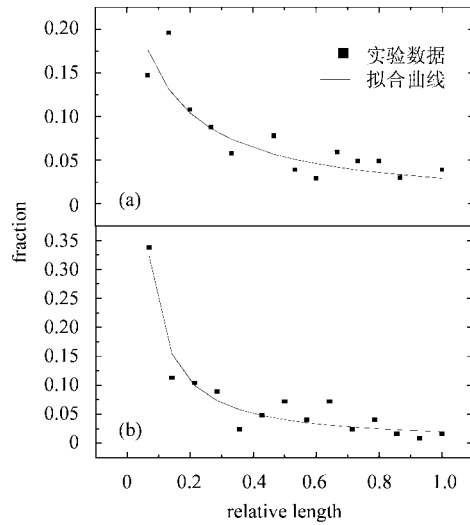


图 6 经 8Gy 的<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 离子辐照后 DNA 碎片的相对长度分布

## 4 结论

通过对<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 两种重离子诱发的 DNA 碎片长度进行 AFM 观测,得到 DNA 分子的 3 种形态随剂量的变化情况以及 DNA 碎片长度的分布函数.结果表明,在同一 LET 值下,随着剂量的增加, DNA 分子的形态由 SC 型逐渐向 OC 型或 L 型变化,且碎片的长度逐渐缩短;在相同辐照剂量下,两种不同 LET 值的重离子,随 LET 值的增加,诱发的 DNA 较短碎片的数目越来越多;具有高 LET 的重离子辐射与低 LET 辐射相比,能够更有效的诱发 DNA 分子发生双链断裂,并使双链断裂的分布更局部和更密集.使用 Tsallis 熵宏观统计理论,对 DNA 碎片长度分布的实验数据的拟合结果表明:两者符合得较好,说明重离子诱发的 DNA 双链断裂在空间上有较强的关联.

感谢 HI-13 串列加速器运行人员在辐照实验中给予的紧密配合,感谢卓益忠研究员在理论上的指导及有益的讨论.感谢军事医学科学研究所的周平坤研究员为实验提供优质的 DNA 样品和中国科学院上海原子核研究所的胡钧教授提供用于 AFM 观测所需的 APTES-云母.

## 参考文献 (References)

- 1 XIA Shou-Xuan et al. Radiobiology. Beijing: The Academy of Military Medical Sciences Press, 1998. 65 (in Chinese)  
(夏寿萱等. 放射生物学. 北京: 军事医学科学院出版社, 1998. 65)
- 2 YANG Chui-Xu, MEI Man-Tong. Space Radiobiology. Guangzhou: Zhongshan University Press, 1995. 23 (in Chinese)  
(杨垂绪, 梅曼彤. 太空放射生物学. 广州: 中山大学出版社, 1995, 23)
- 3 YUAN Xiong, YE Chang-Qing, ZHOU Ping-Kun. Space Medicine & Medical Engineering, 1997, **10**(4): 309 (in Chinese)  
(袁雄, 叶常青, 周平坤. 航天医学与医学工程, 1997, **10**(4): 309)
- 4 Hoglund E et al. Int. J. Radiat. Biol., 2000, **76**(4): 539
- 5 Newman H C et al. Int. J. Radiat. Biol., 1997, **71**(4): 347
- 6 Pang D et al. Scanning Microscopy, 1996, **10**(4): 1105
- 7 Pang D et al. Radiat. Res., 1998, **150**: 612
- 8 Murakami M, Hirokawa H, Hayata I. J. Biophys. Methods, 2000, **44**: 31
- 9 Boichot S et al. Radiation Protection Dosimetry, 2002, **99**: 143
- 10 Sotolongo-Costa O, Rodriguez A H, Rodgers C J. Entropy, 2000, **2**: 172; www.mdpi.org/entropy/
- 11 Harremoes P, Topse F. Entropy, 2001, **3**: 191; www.mdpi.org/entropy/

Investigation of DNA Strand Breaks Induced by  $^7\text{Li}$  and  $^{12}\text{C}$  Ions\*SUI Li<sup>1;1)</sup> ZHAO Kui<sup>1,2</sup> NI Mei-Nan<sup>1</sup> GUO Ji-Yu<sup>1</sup> LUO Hong-Bing<sup>1,3</sup>MEI Jun-Ping<sup>1,4</sup> LU Xiu-Qin<sup>1</sup> ZHOU Ping<sup>1</sup>

1(China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

2(The Key Laboratory of Beam Technology and Material Modification of Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

3(College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

4(Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

**Abstract** Deoxyribonucleic acid (DNA) is an important biomacromolecule. It is a carrier of genetic information and a critical target for radiobiological effects. Numerous lesions have been identified in irradiated DNA. DNA double strand breaks (DSBs) are considered as the most important initial damage of all biological effects induced by ionizing radiation. In this experiment, DNA DSBs induced by heavy ions in the early period were investigated with atomic force microscopy (AFM). Choosing  $^7\text{Li}$  and  $^{12}\text{C}$  heavy ions with different LET values delivered by HI-13 tandem accelerator respectively, purified plasmid DNA samples in aqueous solution were irradiated at different doses. AFM was used for nanometer-level-structure analysis of DNA damage induced by these two kinds of heavy ions. Measurement of the DNA fragment lengths was accomplished with the Scion Image analyzed software. Change laws of three forms of DNA, supercoil, open circular and linear form as dose increased were obtained. Distributed function of DNA fragment length was also obtained, and fitted with Tsallis entropy statistical theory.

**Key words** heavy ion, double strand break, linear energy transfer, atomic force microscopy, plasmid DNA

Received 31 December 2003

\* Supported by National Natural Science Foundation of China (10175095)

1) E-mail: lisui@iris.ciae.ac.cn