

电离辐射致 DNA 双链断裂研究方法及统计模型

周莉薇 陈晓明 张建国 柳芳

(西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621010)

摘要 DNA 既是生命物质中信息的载体,也是辐射生物效应最主要的靶分子。电离辐射通过射线的直接作用和间接作用引起 DNA 分子的多类型损伤,其中 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSB)是辐射引起的各种生物效应中最重要的原初损伤之一,成为辐射生物学的重点。目前 DSB 研究的主要方法包括拉曼光谱技术、原子力显微镜、单细胞凝胶电泳、脉冲场凝胶电泳、 γ H2AX 分析技术、早熟染色体凝集等,研究 DSB 的统计模型包括随机断裂模型、Moment 法、Tsallis 熵模型、平均分子量法,在此均得到总结,最后探讨了 DSB 辐照热点的研究前景。

关键词 DNA 双链断裂, 双链断裂研究方法, 双链断裂统计模型, 双链断裂辐照热点

中图分类号 O056, Q6, Q7

电离辐射通过射线的直接作用和间接作用造成细胞 DNA 分子的多种类型损伤,包括 DNA 链断裂、形成 DNA-DNA 交联、DNA-蛋白质交联等。在辐射所致 DNA 损伤研究中,不可修复的 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSB)会引起重要的生物学损伤,甚至导致生物体的死亡。因此对 DSB 的研究成为辐射生物学探讨的重点之一。在 1996 年,美国(Lawrence berkeley laboratory, LBL)Cooper 实验室首先报道了 DNA DSB 非随机分布的现象,接着在 1997 年英国 Gray 实验室和德国 GSI 相继报道了该现象。在此之后,国内外相继报道了许多有关 DNA、DSB 非随机分布的研究,认为 DSB 断裂分布和 DNA 序列相关,DNA 对辐照具有敏感位点。在对 DSB 研究深入的同时,检测技术不断完善,本工作就目前 DSB 研究方法和统计模型进行总结。

1 DSB 研究方法

1.1 传统研究方法

早期用于研究 DSB 的方法有粘弹性测量法、速度沉降法、中性滤膜洗脱法等,但这些方法并不是直接测定 DSB,而且灵敏度也相对较低。1987 年,吴一迁等^[1]还曾利用中性梯度沉降法研究 DNA 的损伤。但这几种方法都有一定的适用范围和局限性,不同程度地存在着灵敏性差,物理基础不清楚及操

作复杂等缺点,已有研究证实,这些方法低估了 DSB 的产额。

1.2 拉曼光谱技术(Raman spectroscopy analysis)

拉曼技术基于光的拉曼效应,利用拉曼谱线的数目,位移的大小和谱线的强度得到有关分子振动和转动的信息,这种技术已被广泛地用于物质成分的分析 and 分子结构的鉴定。拉曼光谱技术在测量生物分子时,具有结构信息量大,测量速度快,操作方法简便等优点,尤其是在测量 DNA 水溶液时,几乎不受水的干扰,因此这种技术可以直接有效地对损伤 DNA 分子进行检测。当 DNA 分子发生构象变化或是结构破坏时,如热变性,酸碱变性,射线诱导或是金属离子,酶,蛋白等引起的 DNA 分子损伤,利用拉曼光谱技术都可以进行研究。在辐照引起的 DNA 损伤方面,主要包括 DNA 的常规拉曼光谱分析^[2];DNA 的激光共振拉曼光谱分析^[3];DNA 在金属表面或电极上吸附行为的表面增强拉曼光谱研究^[4];DNA 的傅立叶变换拉曼光谱研究^[5]等。通过物质的拉曼光谱分析,可以观察到 DNA 碱基的互变异构,DNA 双螺旋结构破坏程度,碱基之间氢键断裂以及垂直的碱基与碱基堆积相互作用的破坏程度等。DNA 分子的拉曼光谱分析反映了 DNA 分子的损伤类型。国内外不少报道都指出了辐

西南科技大学核废物与环境安全国防重点学科实验室基金(07JGZB07)、中国工程物理研究院预研基金(052056)、中国工程物理研究院核物理与化学研究所资金(07zh0132)资助

第一作者:周莉薇,女,1983 年 1 月出生,2005 年毕业于西南科技大学,植物学硕士

通讯联系人:陈晓明

收稿日期:初稿 2008-04-18,修回 2008-06-04

照后 DNA 分子的拉曼光谱强度随辐照剂量的增加而增强,说明了辐照对 DNA 损伤的剂量效应。

1.3 原子力显微镜 (Atomic force microscopy analysis, AFM)

Binning 等^[6]在 1986 年发明了 AFM。AFM 是一种利用光杠杆原理设计的光束偏转技术。

1996 年美国乔治华盛顿大学的 Pang 等^[7]首次用 AFM 在水溶液中测量电子辐射引起的 DNA 双链断裂。此后,相继报道了利用 AFM 观测 X 射线、中子、电子、粒子以及 ^{60}Co 的 γ 射线辐照质粒 DNA 的损伤情况,观测到了闭环(完整 DNA 分子),开环(单链断裂)和线性(双链断裂)三种形态的质粒 DNA 及它们随剂量的变化^[8-10]。孔福全^[11]利用 AFM 对重离子辐照 DNA 引起的 DNA 碎片进行观测,分析了传能线密度(Linear energy transfer, LET)值对重离子诱发的 DNA 双链断裂的影响。隋丽等^[12]利用 AFM 对 ^7Li 离子致 DNA 损伤的直接和间接作用进行观测。AFM 应用较为广泛,可以直接观察 DNA 链经过辐照后的损伤情况,多用于质粒辐照后的研究,并且可以结合 Tsallis 熵模型对所得的实验结果进行统计分析,方法简单直观。

1.4 单细胞凝胶电泳 (Single cell gel electrophoresis, SCGE)

单细胞凝胶电泳又称彗星试验(Comet assay),是由 Ostling 等^[13]建立,经 Singh 等^[14]改进的一种研究有核细胞 DNA 损伤的技术。包埋在琼脂糖凝胶中的细胞,在电泳条件下其断裂的 DNA 碎片进入凝胶,只有当 DNA 双链断裂(DSB)时,才使 DNA 断片进入凝胶中迁移。电泳时,带负电荷的 DNA 移向正极,形成“彗星”状影像,DNA 损伤越多,进入尾部的 DNA 碎片越多。尾矩尾部 DNA 百分数 $\times$ 尾长(μm)与辐射剂量呈线性相关,成为较为精确地测定 DNA 损伤的分析指标^[15]。这是一种在单细胞水平上研究 DNA 单、双链断裂和碱性不稳定位点的方法,具有敏感、稳定、快速的优点,已被广泛应用于分析不同辐照对动植物^[16]细胞中 DNA 产生的损伤效果^[17]以及 DNA 的修复程度^[18],并且可以分析辐照后 DNA 单链和双链断裂产额与辐照剂量的相关性,对辐射防护研究具有很大价值^[19]。这种方法对研究辐射引起的 DNA 单链双链断裂很有效,可以用来分析辐射剂量与 DSB、SSB 产额间的关系,操作比脉冲场凝胶电泳简易,效果相当。但是,由于这种方法操作中 DNA 形成“彗星”状影像,对 DNA 片段进行分离回收时存在局限性,

相对而言脉冲场凝胶电泳就具有独到的优势。

1.5 脉冲场凝胶电泳 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

脉冲场电泳通过施加两个不同方向周期性交替电场,促使 DNA 分子在胶块中进行迁移,克服了普通恒场电泳无法分离大片段 DNA ($>50\text{kb}$) 的局限。脉冲场凝胶电泳被广泛用于研究辐照后 DNA 双链断裂,及其断裂产额与辐照剂量以及不同射线传能线密度之间的关系^[20,21],并且在研究 DNA 双链断裂非随机分布方面,脉冲场凝胶电泳效果显著。Stenerlöv 等^[22]在 2000 年报道了辐照后 DNA 的非随机分布现象,在脉冲场电泳中,大片段 DNA 条带可以得到很好分离,从而在分析辐射剂量与 DNA 损伤之间关系的同时,可以回收 DNA 条带以进一步分析,在分析 DNA 辐射裂解位点方面具有很好的利用价值。

1.6 γ H2AX 分析技术 (γ H2AX analysis)

1998 年, Rogakou 等^[23]首先观察到在 DNA 双链断裂发生的瞬间,组蛋白 H2AX 其羧基端一高度保守的 SQE 结构域中的丝氨酸残基(Ser-139)迅速被磷酸化,并聚集到 DSB 断裂位点形成 γ H2AX 焦点,报道了利用特异性抗体免疫荧光法研究 γ H2AX 来测定 DSB 的方法,证明了 γ H2AX 焦点和 DSB 在数量上的相关性,即一个 γ H2AX 焦点对应一个 DSB 的产生。有研究指出 H2AX 磷酸化形成的 γ H2AX 是 DNA DSB 的早期事件,在苯并芘(BaP)和紫外线(UVA)共同作用下的 CHO-K1 细胞,能明显诱导形成 γ H2AX,并具有剂量依赖关系,并且在没有改变细胞生存率的低浓度(BaP: 10^{-9}mol/L ; UVA: $016\text{J}/\text{cm}^2$)下就可以测到 γ H2AX^[24]。由于 γ H2AX 是细胞对 DSB 的敏感反应,并且对 DNA 损伤的修复起重要的连接作用^[25],因此 γ H2AX 分析手段不仅可以应用于对 DSB 的研究,清楚地观测到以 γ H2AX 焦点形成的特征 DNA 双链断裂的区域^[26],还可被应用于对 DSB 损伤后的修复研究。

1.7 早熟染色体凝集 (Premature chromosome condensation analysis, PCC)

早熟染色体凝集现象早在 1970 年 Johnson 等^[27]在灭活的仙台病毒介导下获得的融合细胞中发现。利用有丝分裂细胞和间期细胞之间的融合,导致间期核被膜崩溃,染色质浓缩,呈现细长的染色体状,从而对染色质的变化进行分析。PCC 主要有两种方

式: 一种是细胞融合 PCC 技术用于研究 G_1 和 G_2 期的染色体, 另一种是化学诱导 PCC, 主要用于研究 G_2 期的染色体。早熟染色体凝集与 γ H2AX 分析技术一样, 可以研究小剂量 ($<1\text{Gy}$) 辐照引起的 DNA 损伤情况, 与 PFGE 相比其对 DSB 的研究更敏感, 并且这种技术在研究损伤后的修复方面也具有优势, 已作为辐照诱导引起的早期损伤的生物剂量计^[28]。

2 DSB 的分析方法

2.1 随机断裂模型

随机断裂模型于 1991 年由 Cook 等^[29]建立, 强调了在初始长度为 n 的 DNA 链经过 r 次随机断裂后碎片的长度 (或分子量) 分布, 通常用长度小于某一阈值 k 的 DNA 断裂碎片产额所占 DNA 碎片总产额的份额来研究 DNA 双链断裂过程, 如典型的释放活性片段法 (Fraction of the activity released, FAR)。

由于脉冲场电泳仪的分辨能力或其他因素的限制, 实验中只能测量一定分子量区间的断裂片段的产额 (通常在 $10\text{kbp} \sim 6\text{Mbp}$ 即 $6 \times 10^3\text{kb}$ 的范围内), 因此, 这种分析方法很适合实验结果分析研究。具有分子量 n 的初始 DNA 链, 经过 r 次断裂后产生分子量低于 k 的 DNA 碎片的总产额^[30]如式(1)。

$$F_{<k} = 1 - \exp\left(-\frac{rk}{n}\right) \left[1 + \frac{rk}{n} \left(1 - \frac{k}{n}\right)\right] \quad (1)$$

通过设定一个比较大的断裂片段分子量, 可以取 $k=10\text{Mbp}$, n 是 DNA 链的大小, n 一般在 Gbp 的范围, 数量级为 10^9bp 。

随机断裂从追踪单个辐射事件出发, 对多个事件的效果求和。这可以从一个侧面反映射线引起的 DNA 双链断裂过程。随机断裂模型并不是严格成立的, LET 的辐照实验和随机断裂模型的计算结果有较大差异。尤其是在 LET 比较大的时候, 由于带电粒子在生物介质中的阻止能 (Stopping power $-\frac{dE}{dx}$) 很大, 单位长度径迹上的能量沉积很大, 沿径迹产生的电离激发很多, 高密度的电离激发导致对细胞组织的损伤很严重。近几年定量研究表明, 随 LET 的增大, 和随机断裂模型相比, 实验测量的断裂片段中分子量比较大的产额减小, 而断裂片段中分子量比较小的产额增多, 断裂片段的分子量分布偏离了随机断裂模型的结果。

2.2 Moment 法

1996 年, Sutherland 等^[31]发表了 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。其计算公式如式(2)。

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

式中, 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} 。虽然 Moment 法在原理上比随机断裂模型更合理, 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。

2.3 Tsallis 熵模型

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, 可以得到随机断裂模型所得到的结果。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, Tsallis 熵可以用来研究这种带有关联的 DNA 双链断裂。利用 Tsallis 熵宏观统计理论推导出的 DNA 双链断裂的分布函数如式(3)。

$$p(l) = \frac{\beta(2-q)}{[1 + \beta(q-1)l]^{\frac{1}{q-1}}} \quad (3)$$

式中, β 为拉格朗日乘子, q 为实数。利用式(3), 可结合 AFM 所观测到的实验数据进行拟合, 从而可以计算出 DSB 的产额大小。

2.4 平均分子量法

2003 年, 周光明等^[32]提出了一种新的计算 DSB

产额的方法名为平均分子量法。该法在形式上十分简单。原理上与 Moment 法有相似,它同样不探究 DSB 片段分布的具体模型,但计算时又充分体现了片段的分布。可被用于 DSB 片段随机分布和非随机分布的计算中。并且在实际操作上更为可行,对荧光扫描结果的处理尤为方便。利用平均分子量法计算 DNA 的双链断裂水平如式(4)。

$$L = \left[\frac{X \times PR}{T} - m \right] \div X = \frac{PR}{T} - \frac{m}{X} \quad (4)$$

式中, m 为细胞中线状双链 DNA 分子的条数, X 为 DNA 分子的总长 (Mbp), PR 为辐照后产生的 DNA 片段释放百分比, T 为 DSB 片段平均大小 (Mbp)。

3 展望

由于放射性污染物的堆积,高背景放射区域以及许多核事故产生了极其严重的影响,人们越来越重视辐射给人类以及环境带来的不良后果。在辐射生物学效应机理研究中,对辐射引起的 DNA 损伤及其自身修复过程研究依然是重中之重。研究手段的不断完善对 DSB 的研究提供了有利条件,并已取得了很多研究成果。但是,在研究方面多为对 DSB 与辐照剂量或剂量率等指标之间关系的统计量化处理,以及研究不同物种对辐照的抗性和修复方面的研究。对于 DNA 序列上的分析,也主要关注于突变序列的特征包括碱基的变化,序列的缺失等方面。对 DNA 是否存在辐射敏化位点的定位研究,目前还处于空白。这可能由于在实验方面对辐射束流有较高的品质要求,对 DNA 敏感性序列进行分析需要更为精细的生物技术手段,并且必须要考虑自由基等的干扰;在理论的统计方面需要量子生物学提出高效的计算模型和高性能的计算资源,因此克服这些问题是如今研究 DSB 热点的关键。

参考文献

- 1 吴一迁,瞿永华,姚根富. 肿瘤, 1987, **16**(3): 124-125
WU Yiqian, QU Yonghua, YAO Genfu. Tumor, 1987, **16**(3): 124-125
- 2 唐伟跃,王杰芳,侯晓强,等. 激光与红外, 2004, **34**(6): 496-497
TANG Weiyue, WANG Jiefang, HOU Xiaoqiang, et al. Laser Infrared, 2004, **34**(6): 496-497
- 3 Wen Z Q, Overman S A, Thomas J R. Biochemistry, 1997, **36**(25): 7810-7820
- 4 Streltsov S, Oleinikov V, Ermishov M, et al. Biopolymers, 2003, **72**(6): 442-454
- 5 Neault J F, Naoui M, Manfait M, et al. Febs Lett, 1996, **382**(1): 26-30
- 6 Binning G, Quate C F, Gerber C. Phys Rev Lett, 1986, **56**(9): 930-933
- 7 Pang D, Popescu G, Rodgers J, et al. Scanning Microsc, 1996, **10**(4): 1105-1110
- 8 Boichot S, Fromm M, Cunniffe S, et al. Radiat Prot Dosim, 2002, **99**(1-4): 143-145
- 9 Pang D, Berman B L, Chasovskikh S, et al. Radiat Res, 1998, **150**(6): 612-618
- 10 Pang D, Rodgers J, Berman B L, et al. Radiat Res, 2005, **164**(66): 755-765
- 11 孔福全. 重离子致 DNA 损伤及修复的研究[D], 河北工业大学, 2005
KONG Fuquan. Study of Lesion and Repair of DNA after Irradiating by Heavy Ions[D], Hebei University of Technology, 2005
- 12 隋丽,郭继宇,孔福全,等. 核技术, 2007, **30**(4): 250-254
SUI Li, GUO Jiyu, KONG Fuquan, et al. Nucl Tech, 2007, **30**(4): 250-254
- 13 Ostling O, Johanson K J. Biochem Biophys Res Commun, 1984, **123**(1): 291-298
- 14 Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. Exp Cell Res, 1988, **175**(1): 184-191
- 15 田云,卢向阳,易克,等. 生命的化学, 2004, **24**(1): 77-78
TIAN Yun, LU Xiangyang, YI Ke, et al. Chem of Life, 2004, **24**(1): 77-78
- 16 王静,蒋磊,王艳,等. 植物学通报, 2007, **24**(2): 189-193
WANG Jing, JIANG Lei, WANG Yan, et al. Chin Bull Bot, 2007, **24**(2): 189-193
- 17 Marcello S, Monica Z, Marco B, et al. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2006, **85**(3): 205-215
- 18 Shunji U, Takashige K, Nobuyuki S, et al. Mutation Research, 2007, **634**(1-2): 135-145
- 19 Dharmendra K M, Soumyakanti A, Cherupally K K N, et al. Mutation Research 2007, **634**(1-2): 69-80
- 20 臧黎慧,魏志勇,李明,等. 中国血液流变学杂志, 2005, **15**(2): 193-196
ZANG Lihui, WEI Zhiyong, LI Ming, et al. Chines

- Journal of Hemorheology, 2005, **15**(2): 193-196
- 21 王芹, 岳井银, 穆传杰. 天津医药, 2006, **34**(6): 399-401
WANG Qin, YUE Jingyin, MU Chuanjie. Tianjin Med J, 2006, **34**(6): 399-401
- 22 Stenerl w B, H glund E, Carlsson J, *et al.* Int J Radiat-Biol, 2000, **76**(4): 549-557
- 23 Rogakou E P, Pilch R, Orr A H, *et al.* Biol Chem, 1998, **273**(10): 5858-5868
- 24 Toyooka T, Ibuki Y. Federation of European Biochemical Societies(FEBS) Letters, 2005, **579**(28): 6338-6342
- 25 Bassing C H, Chua K F, Sekiguchi J, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(12): 8173-8178
- 26 Rogakou E P, Boon C, Redon C, *et al.* Cell Biology, 1999, **146**(5): 905-915
- 27 Johnson R T, Rao P N. Nature, 1970, **226**(23): 717-722
- 28 江波. 国外医学放射医学核医学分册, 2005, **29**(6): 286-289
JIANG Bo. Foreign Medical Science. Section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2005, 2005, **29**(6): 286-289
- 29 Cook V E, Mortimer R A. Radiation Research, 1991, **125**(11): 102-106
- 30 Foray N, Arlett C F, Malaise E P. Int J Radiat Biol, 1999, **75**(12): 1589-1595
- 31 Sutherland B M, Bennett P V, Sutherland J C. Anal Biochem, 1996, **239**(1): 53-60
- 32 周光明, 李文建, 高清祥, 等. 原子核物理评论, 2003, **20**(1): 52-54
ZHOU Guangming, LI Wenjian, GAO Qingxiang, *et al.* Nucl Phys Rev, 2003, **20**(1): 52-54

Detecting methods and statistical models in studying on DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation

ZHOU Liwei CHEN Xiaoming ZHANG Jianguo LIU Fang

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

ABSTRACT A DNA molecule is both the carrier of biological information and the main target of biological effects induced by ionizing radiation. Irradiation leads to many types of DNA damage by the direct and the indirect radiation effect. DNA double-strand breaks (DSB) induced by ionizing radiation represent the primary damage of all bio-effects. Currently, the detecting methods dealing with DSB include raman spectroscopy analysis, atomic force microscopy analysis, single cell gel electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, γ H2AX analysis and premature chromosome condensation analysis, etc. And the statistical models of DNA DSB involve in the random fracture model, the moment method, the tsallis entropy model and the average molecular weight method. Both of them have been discussed in this paper. Finally, the research prospect of the DNA DSB radiation hotspot is presented.

KEYWORDS DNA double-strand breaks, Double-strand breaks detect methods, Double-strand breaks statistical models, Double-strand breaks radiation hotspot

CLC O056, Q6, Q7