

γ 辐射对 DNA 交联的影响

马玉琴 于明珠 宋学玲

(中国科学院生物物理研究所)

摘要: 象 DNA 链断裂一样, DNA 交联是一种重要的辐射损伤类型。我们研究了关于稀溶液中 DNA 分子的链间交联。结果表明, DNA 分子链间交联仅在辐照剂量为 20~100 Gy 的范围内出现。这种效应依赖于 DNA 的浓度和(G+C)%含量而与剂量率无关。5'-溴尿嘧啶和半胱氨酸的辐射敏化作用和保护作用也得到证实。

关键词: γ 辐射; 交联; 敏化剂; 保护剂。

引言

由于 DNA 在细胞辐射敏感性上所显示的重要作用, 许多学者对辐射诱发的 DNA 结构与功能变化的研究发生兴趣。人们采用分离好的 DNA 在可控制的条件下, 进行电离辐射实验, 取得了关于 DNA 受照后一系列物理化学变化的资料; 另一方面生物学测量表明这些变化控制着受照 DNA 的生物活性。 γ -辐射后 DNA 的主要化学变化为: 碱基改变, 链断裂及 DNA 分子交联。对前两种变化研究得比较多, 而 DNA 分子的交联, 仅在 60 年代末才报导了照射干燥 DNA 样品产生 DNA 分子交联的情况。随后在受照 DNA 水溶液中也检出 DNA 分子交联。但至今为止, 对交联的形成和它对 DNA 性能影响的研究, 工作还不多。本文目的是研究 γ -辐照后 DNA 链间形成的交联(DNA interstrand cross-linking), 一方面说明辐射诱发 DNA 交联的过程和机制, 另一方面讨论影响交联的几个因素。

材料和方法

(1) DNA: 从枯草杆菌(B. Subtilis Ki-2-Sm^r) 分离提取转化 DNA 是按 Marmur's 方法进行^[1]的。用 0.1 M NaCl-0.01 M 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)将 DNA 配成不同浓度的溶液; 小牛胸腺 DNA MG $1 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^7$ (西德), 配法同上。

(2) 非啉溴红(EB): 浓度为 101.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液(英国)

(3) 荧光分光光度计: WFD-9 型(中国科学院生物物理研究所)

(4) 交联测定方法: DNA 分子链间交联的测定, 采用 Burnotte 的荧光分析法^[2]。该法是根据非啉溴红(EB)和 DNA 结合时, 它的荧光量子产额增加的原理设计的。每个 DNA 分子的平均交联数 Z, 由方程式(1)求出:

$$Z = -\ln f_D \quad (1)$$

其中 f_D 为天然和变性 DNA 分子混合物(1:1)中变性分子的份数。 f_D 由方程式(2)给出:

$$\frac{F_n - F_M}{F_n - F_0} = f_D \left(1 - \frac{K_D}{K_n} \right) \quad (2)$$

式中 F_n 天然 DNA 和 EB 结合时所发射的荧光值; F_0 为 EB 的荧光值; F_M 为天然和变性 DNA 混合时和 EB 结合时的荧光值; K_D 和 K_n 为比例常数。

该方法简便快速, 荧光测量所选择的最佳激发波长 $\lambda_{DS} = 470 \text{ nm}$, 发射波长 $\lambda_{EM} 605 \text{ nm}$, 一次测定需要 $30 \mu\text{g DNA}$ 。方法的标准偏差 $\leq 5\%$ 。

(5) 照射: 用 ^{60}Co γ 射线源照射, 距离为 60 cm , 剂量率为 10 Gy/min , 样品盛放在加盖玻璃瓶内, 于室温在空气饱和的条件下照射。

结果与讨论

1. DNA 交联与剂量的关系

与干燥 DAN 样品相比, 在稀释溶液中 DNA 形成交联的可能性要小得多。由图 1 可见, DNA 交联的峰值主要分布在 100 Gy 以下的低剂量区, 每个 DNA 分子的平均交联数在 $0.2-2.2$ 之间; 当照射剂量达到 200 Gy 时, 形成的交联仅为 0.2 左右。由于 DNA 稀释溶液经 γ -辐照后所发生的交联作用, 不像碱基改变和链断裂那样明显, 到目前为止, 照射 DNA 水溶液时, 还未曾把交联率作为各种参数的函数来检验。只能说明辐射也能引起 DNA 溶液中分子交联, 实验测得的交联值, 相当于 Burnotte 等人^[2]用交联剂 HNO_2 所产生 DNA 链间交联 ($0.52-1.58$)。由实验得知, DNA 链间交联受剂量率变化的影响不大。在照射剂量相同而剂量率相差 10 倍的情况下, 由图 2 曲线 A (1 Gy/min) 和曲线 B (10 Gy/min) 所表示的 DNA 交联随剂量改变而变化的趋势十分相似, 仅在交联值上略有差异。

2. 影响 DNA 链间交联的几个因素

(1) 浓度效应 DNA 链间交联依赖于 DNA 样品的浓度。实验选择四种不同浓度的 DNA, 分别在三个剂量点测定其交联值, 结果列在表 1。由表 1 可见, 在 γ -辐射作用下, DNA 交联的产生不仅取决于辐照剂量的大小, 而且与 DNA 浓度有关。在同一剂量点 DNA 浓度越高, 每个 DNA 分子的平均交联数也越高。当 DNA 浓度低于 $10 \mu\text{g/ml}$ 时, 就无法检出交

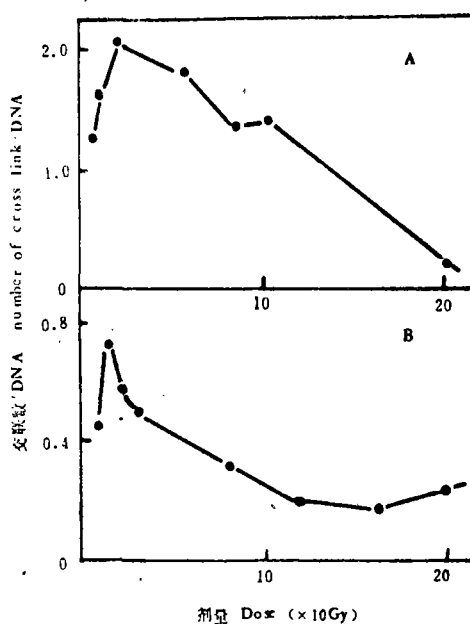


图 1 DNA 交联和剂量的关系曲线

Fig 1 Dose-effect curve for DNA cross-linking

A. 枯草杆菌 DNA 溶液 $300 \mu\text{g/ml}$

A. In $300 \mu\text{g/ml}$ *Bacillus Subtilis* DNA aqueous solution

B. 小牛胸腺 DNA 溶液 $100 \mu\text{g/ml}$

B. In $100 \mu\text{g/ml}$ Calf thymus DNA aqueous solution

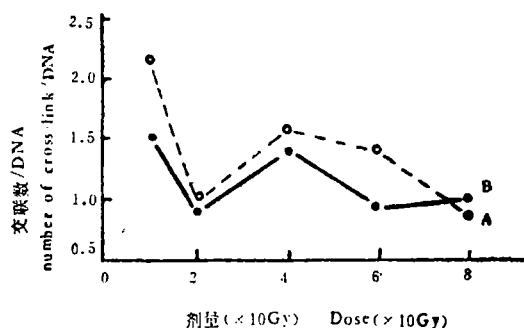


图 2 DNA 交联和剂量率的关系曲线

Fig 2 Dose rate-effect curve for DNA cross-linking

A 1 Gy/min B 10 Gy/min

表 1 DNA 交联的浓度效应*
Table 1 Concentration effect of DNA cross-linking

DNA 浓度 DNA Concentration $\mu\text{g/ml}$	DNA 交联数/分子 The mean number of cross-linking per DNA molecule		
	6.0 (Gy)	20 (Gy)	100 (Gy)
12.8	0	0.585	0.010
63.8	1.440	0.886	0.163
127.5	1.613	0.952	1.117
300.0	1.785	1.359	1.855

* 样品为 B. Subtilis 转化 DNA

联。这一点和 Henglein^[3] 介绍的一致。

(2) 和环境介质的关系 Hagen 等人^[4]提出氧的存在能部份抑制 DNA 的二聚合作用。即由辐射诱发的 DNA 分子自由基($M\cdot$), 在有氧时形成过氧化自由基(反应式 1), 因而抑制了两个自由基($M\cdot$)相互反应生成二聚物($M-M$)(反应式 2)。



故他认为在 N_2 中 γ -辐照较 有氧时能产生更多的 DNA 交联。我们在不同气态条件下, 观察了 B. Subtilis 转化 DNA ($65 \mu\text{g/ml}$) 水溶液的交联。由表 2 可看出, 受照溶液充入 N_2 或 N_2O 在一般情况下都比有氧时能生成更多的 DNA 分子交联(但也出现在 20 Gy 时偏低的情况)。这说明在稀水溶液中 DNA 分子链间交联较为复杂, 氧的部份抑制作用的过程和影响因素, 尚待研究。

表 2 不同气态条件下 DNA 的交联
Table 2 DNA cross-linking varies with various gases in irradiated sample

Medium 介质	剂量 (Gy) dose (Gy)			
	6	10	20	40
N_2	1.139	1.058	0.662	1.309
N_2O	0.926	1.087	0.837	1.120
Under oxygen 有氧时	0.667	1.033	0.983	0.725

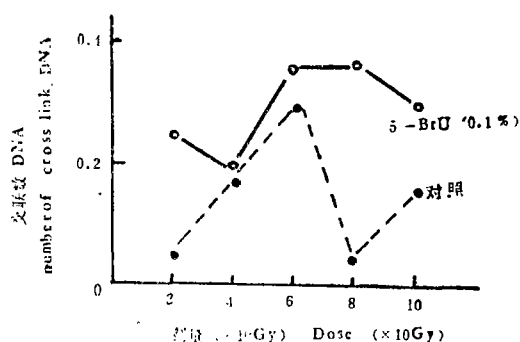


图 3 5'-溴尿嘧啶的敏化效应

Fig 3 Sensitization by 5'-bromouracil

(3) 碱基含量对交联的影响 $(G+C)\%$ 系指 DNA 的鸟嘌呤和胞嘧啶对总碱基的百分数。在 γ -射线作用下由于 DNA 的辐射损伤所致, 受照样品中 $(G+C)\%$ 含量会发生明显的改变。与此同时, $(G+C)\%$ 的变化又会使 DNA 分子的交联发生变化。实验结果表明, $(G+C)\%$ 含量越高, DNA 分子交联值也越高。见表 3。由 γ -辐射所产生的交联可能类似化学交联剂(例如氮芥)的作用机制, 交联主要发生在 DNA 的两条链的鸟嘌呤之间^[5]。

(4) 5'-溴尿嘧啶的影响 在 DNA 样品

表 3 (G+C)%和 DNA 交联的关系
Table 3 Effect of (G+C) % on DNA cross-linking

测量内容 Determine the contents	剂量(Gy) dose (Gy)		
	0	80	200
(G+C)% 交联数/DNA The mean number of cross-linking per DNA molecule	56.6	44.4	32.2
	0.401	0.306	0.238

* 样品为小牛胸腺 DNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

中, 掺入 0.1% 的 5'-溴尿嘧啶, 由图 3 可清楚看出, 加入 5'-溴尿嘧啶可使 DNA 交联反应敏化, 实验组的交联值明显高于对照组。

(5) 半胱氨酸的影响 由图 4 看出, 在 0.1% 半胱氨酸存在下, 受照 DNA 样品的交联数明显低于对照组。说明象半胱氨酸这种含有-SH 基的化合物, 可以阻止 DNA 分子交联, 是一种良好的保护剂。

小 结

综上所述, 在 DNA 稀释溶液中, 由 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照所致, DNA 分子可以形成链间交联, 其峰值主要分布在 100 Gy 以下的低剂量范围。

在 DNA 稀释溶液中, DNA 链间交联过程比较复杂, 它受 DNA 浓度和环境介质等因素的影响。加入适当的敏化剂如 5'-溴尿嘧啶或加入适当的保护剂如半胱氨酸, 都可以改变 DNA 分子交联状况。

注: 本文在第二届全国辐射研究学术会议上交流。

参 考 文 献

- [1] J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218(1961).
- [2] J. Burnotte and W. G. Verly, *Biochim. Biophys. Acta.*, 269, 370~375(1972).
- [3] A. Henglein and W. Schnabel, in M. Ebert and A. Howard eds., "Current topics in radiation research". Vol. II, p. 1, Amsterdam: Northland Publ. Co, 1966.
- [4] U. Hagen and H. Wellstein, *Strahlentherapie.*, 128, 565(1965).
- [5] H. Dertinger and H. Jung, Translated by Institute of Biophysics, Academia sinica. Lab. One group two Molecular radiation biology science press, 1975.

(1983 年 8 月 5 日收到)

EFFECTS OF GAMMA-IRRADIATION ON DNA CROSS-LINKING

Ma Yuqin Yu Mingzhu Song Xueling

(Institute of Biophysics, Academia Sinica)

ABSTRACT DNA cross-linking is an type of radiation damage as important as DNA strand-break. The DNA interstrand cross-linking in the dilute solution has been studied, and the result showed that DNA interstrand cross-linking only presented with in the irradiation dose range of 20~100 Gy. The effect depends on concentrations and G-C percentage of DNA and is independent of dose-rate. The radioprotective effects of cysteine and radiosensitive effects of 5'-Bromouracil were demonstrated as well.

KEY WORDS γ -irradiation; Cross-linking; Sensitizing agent; Protective agent.

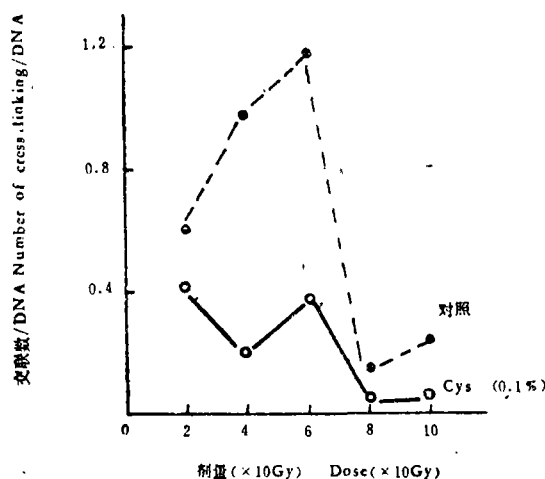


图 4 半胱氨酸的保护效应

Fig 4 Protective effect by cysteine