

质粒 pBR322 的 γ 辐射损伤效应

周丽君* 方允中 章扬培 魏 康

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京100850)

摘要 采用琼脂糖凝胶电泳及激光密度扫描仪和积分分析, 观察了质粒 pBR 322 DNA 的 γ 辐射效应。发现随照射剂量的增加, 超螺旋质粒所占比例逐渐下降, 而开环质粒所占比例相应升高; 运用 OH 自由基清除剂甲酸钠进一步观察到清除 OH 自由基后, 质粒 pBR 322 的辐射效应大为减轻。结果提示其损伤主要是通过水的辐解产物 OH 自由基的间接作用而引起的。

关键词 γ 辐射, DNA 损伤, 质粒 pBR 322, 清除剂

质粒是存在于细菌染色体外的独立遗传单位, 它的结构简单, 构型呈双链闭环超螺旋状(SC)。如果其中一条链断裂, 构型就变成开环分子(OC); 如果两条链在相对部位同时发生断裂, 就变成线状分子(L)。由于上述三种不同构型的质粒 DNA 在琼脂糖凝胶电泳中的迁移率不同, 故可用电泳法将它们分开, 并可通过溴化乙锭(EB)染色显示其相对含量^[1]。因此质粒除广泛用于基因工程等方面研究外, 近年来还作为理想的材料用于辐射所致细胞 DNA 损伤及修复的研究^[2-4]。本文在过去研究的基础上, 通过测定质粒构型变化, 建立了测定辐射所致质粒 DNA 链断裂的方法, 并用此方法研究了 γ 辐射对质粒 pBR 322 DNA 的辐射损伤效应。

1 材料与 方法

1.1 质粒 pBR 322 DNA 提取

参照 Sambrook 等^[5]的方法从 E. coli HB 101 中提取并纯化质粒 pBR 322, 溶于 TE(10 mmol/L 三羟甲基胺基甲烷, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸, pH 8.0)缓冲液中, 于 -20℃ 下保存备用。

1.2 ^{60}Co γ 辐射

取 3 μl 的质粒 pBR 322(约含 1 μg DNA)放入 eppendorf 管中, 加入 12 μl 无菌水, 混匀后于 4℃ 冰浴下用 ^{60}Co γ 辐射, 剂量率 4.18 Gy/min。

为观察甲酸钠对质粒 pBR 322 的辐射保护作用, 取适当浓度的甲酸钠(CP), 加入含 pBR 322 的 TE 液中, 混合均匀, 照射条件同上。

1.3 琼脂糖凝胶电泳

应用 0.8% 琼脂糖和电泳缓冲液 TBE(0.089 mol/L Tris-硼酸, 0.002 mol/L EDTA); 采用 SCR-4 型高压电泳仪装置, 电压 60 V, 时间 4 h。

1.4 电泳后样品的处理和测定

电泳后的凝胶用新鲜配制的 EB(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)于室温下染色 40 min, 在紫外监测灯下观察并照相。底片用 LKB 202 型激光密度仪扫描, 并用积分仪定量计算样品中不同构型的 DNA 所占比例,

* 现在海军总医院工作

收稿日期: 1991-09-02

以此表示辐射所引起的 DNA 链断裂。

2 结 果

2.1 质粒 pBR 322 DNA 的辐射损伤

20—100 Gy γ 辐射质粒 pBR 233 后进行琼脂糖凝胶电泳, 从其电泳图谱中可看出, 随着照射剂量的增加, OC DNA 带亮度逐渐增加, 而 SC DNA 带亮度逐渐减弱。说明随照射剂量增加, OC DNA 的含量逐渐增多, 而 SC DNA 的含量相应减少。与不照射的对照样品相比, 20 Gy 辐射的损伤效应已相当明显。

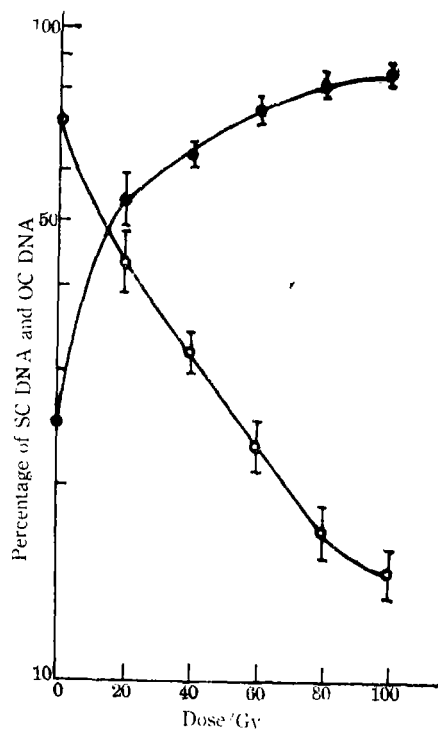


Fig 1. The dose curve for configuration variety of plasmid pBR 322 DNA after γ irradiation
(○) SC DNA (●) OC DNA

对 DNA 电泳区带的激光密度扫描和积分计算, 可得出 OC DNA 与 SC DNA 所占比例的相对含量。它们与辐射剂量的关系曲线如图 1。可以看出在 0—100 Gy 剂量范围内, OC DNA 所占比例的增加是二相的, 有快速增加区(0—20 Gy)及缓慢增加区(20—100 Gy)。

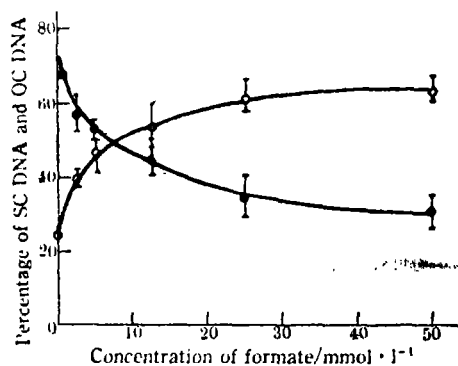


Fig 2. Effect of formate on configuration variety of plasmid pBR 322 DNA after 60 Gy irradiation
(△) SC DNA (●) OC DNA

2.2 甲酸钠对质粒 pBR 322 DNA 的辐射保护作用的影响

在质粒 pBR 322 DNA 样品中加入 2.5—50.0 mmol/L 甲酸钠, 经 60 Gy 辐射后, 从其电泳谱中可以看出, 随着加入甲酸钠浓度的增加, SC DNA 带亮度逐渐增强, 而 OC DNA 带相应减弱。SC DNA 和 OC DNA 相对含量与甲酸钠浓度关系曲线如图 2。可明显观察到 SC DNA 所占比例较未加甲酸钠的大为增加。从图 2 还可看出, 当甲酸钠浓度达到 25 mmol/L 时, SC DNA 的增加及 OC DNA 的减少趋势变缓, 说明甲酸钠虽可以降低质粒 pBR 322 DNA 的辐射损伤, 但其防护作用有一定的极限。

将 25 mmol/L 甲酸钠加入质粒 pBR 322 中, 以 100—500 Gy 辐射, 质粒 pBR 322 中 OC DNA 与 SC DNA 相对百分含量与剂量的关系见图 3。可看出甲酸钠能提高质粒 pBR 322 DNA 对 γ 辐射的耐受性, 有一定的辐射防护作用。

此外, 运用作图法比较加入甲酸钠前后(见图 1 及 3)的 D_{37} 值发现, 加甲酸钠前超螺旋 DNA

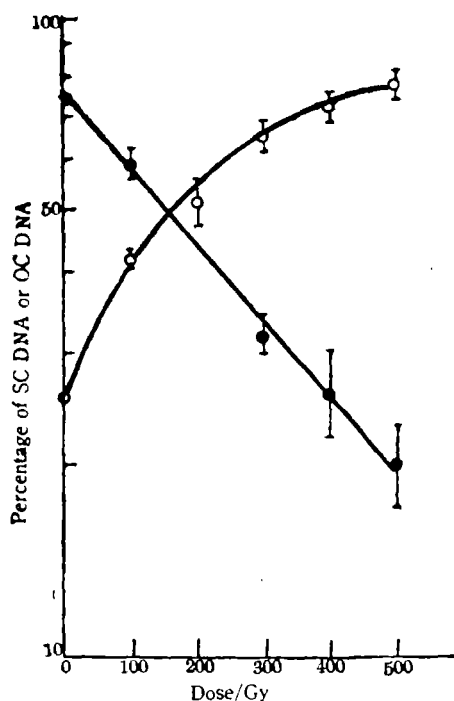


Fig 3. Effect of 25 mmol/L of formate on configuration variety of pBR 322 DNA after γ -irradiation
The data were $\bar{X} \pm SE$ from 4—7 independent experiments
(○) SC DNA (●) OC DNA

的 D_{37} 值约 30 Gy, 而加入 25 mmol/L 甲酸钠后其 D_{37} 值提高到约 260 Gy。

3 讨 论

电离辐射能引起 DNA 分子多种类型的损伤^[6]。本文通过观察 γ 线照射质粒 pBR 322 DNA 后超螺旋和开环构型相对含量的变化, 探讨电离辐射所致质粒 DNA 的损伤效应。结果说明, 在本实验剂量范围内, γ 辐射对质粒 pBR 322 DNA 的辐射损伤主要表现为单链断裂, 此结果与文献[7]一致。从图 1 中显示的照射后 OC DNA 增加的二相现象, 即低剂量的快速增加和高剂量的缓慢增加, 说明高剂量照射不但产生 DNA 单链断裂, 而且产生一定数量的双链断裂, 使部分 OC 构型变为 L 构型, 因而 OC DNA 的增加变缓慢。由于所产生的双链断裂 DNA 片段分子大小不一致, 很难显示出电泳区带。

甲酸钠是已知的 OH 自由基清除剂^[8]。如果辐射损伤效应主要来自水分子所产生的 OH 自由基, 则在自由基清除剂甲酸钠存在下, 质粒 pBR 322 的辐射损伤效应可大为减轻。从本文的实验结果看, 当加入甲酸钠后, pBR 322

DNA 单链断裂明显减少, 表现为随着甲酸钠浓度的增加, SC DNA 所占相对含量大为提高, 但未达到未照射的质粒中 SC DNA 的水平。这表明电离辐射对质粒 pBR 322 DNA 的损伤效应, 主要来自辐解水所形成的 OH 自由基的间接作用, 同时也可能有部分为射线的直接作用所致。

参 考 文 献

- 1 彭秀玲, 袁汉英. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学出版社, 1987: 36
- 2 Hempel K, Mildenerberger E. Int. J. Radiat. Biol., 1987, 52: 125
- 3 Blazek E R, Peak M J. Int. J. Radiat. Biol., 1988, 53: 237
- 4 Thacker J. Int. J. Radiat. Biol., 1986, 50: 1
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning 2, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 1.21
- 6 Hutchinson F. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., 1985, 32: 115
- 7 Herskind C. Int. J. Radiat. Biol., 1987, 52: 565
- 8 Hart E J. J. Phys. Chem., 1952, 56: 594

(下转第 57 页 See p 57)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ACTIVE ENTITIES IN INTESTINE HOMOGENATE THOSE ENHANCING THE CRYPT SURVIVAL IN MICE AFTER γ -IRRADIATION

Zeng Guiying Chen Binfu Liu Aiping Zhou Yuankai

(Fourth Military Medical University, Xian 710032)

ABSTRACT The intestine homogenate of mice was undergone stepwise procedure of heating, centrifugation, salting out and nucleic acid isolation, and each fraction was subjected to biological activity assay using the method of crypt counting per unit intestine area in mice. The results showed that the nucleic acid extracted from intestine homogenate, either DNA or RNA, was capable of enhancing the crypt survival in mice after γ -irradiation. These are consistent with our previous results obtained by using the crude extract of intestine homogenate. Therefore, the crypt survival enhancing entities in intestine homogenate of mice are identified to be nucleic acids.

KEYWORDS Biological activity assay, Efficacious component, Nucleic acid, Irradiation, Intestinal gland recovery

(上接第30页 Continued from p 30)

THE EFFECT OF γ -RAY IRRADIATION ON PLASMID pBR 322 DNA

Zhou Lijun Fang Yunzhong Zhang Yangpei Wei Kang

(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

ABSTRACT Using the agarose gel electrophoresis in combination with laser densitometer and recording integrator, the effect of γ -ray irradiation on plasmid pBR 322 was studied. It was found that the amount of supercoiled (SC) DNA decreased with the increase of irradiation dose, whereas the nicked circular (OC) DNA increased. Formate, a well known hydroxyl free radical scavenger, could decreased the radiosensitivity of the pBR 322 DNA, indicating that the effect of the ^{60}Co irradiation on plasmid was mainly attributable to the indirect action of radiation, Which is resulted from OH radical produced by the radiolysis of water, giving rise to single strand break of DNA.

KEYWORDS γ -irradiation, DNA damage, Plasmid pBR 322, Free radical scavenger