

γ 辐射致 SINPV 的 DNA 链断裂研究*

曾 蓉 王珣章

(中山大学昆虫学研究所, 广州 510275)

张纯祥 罗达玲 李冕丰

(中山大学物理学系)

摘 要 提出用琼脂糖凝胶电泳法, 分剂量段进行两次电泳, 再利用标准 DNA 将各段连接的方法, 在 1~100 kGy 宽剂量范围, 测定⁶⁰Co γ 射线辐照后 DNA 单链和双链断裂频率, 得出 DNA 链断裂频率与吸收剂量的关系. 实验表明, SINPV 病毒的 DNA 链断裂 γ 辐射响应, 可以用单靶一次击中和二次击中复合模型来描述.

关键词 SINPV, DNA 单链和双链断裂, γ 辐射

分类号 Q691.5

DNA 的损伤是生物体辐射损伤的关键. 实验表明, 各种辐射引起的 DNA 单链断裂都与吸收剂量呈线性关系^[1], 而低 LET 辐射引起的 DNA 双链断裂, 却存在较大的分歧^[2~4]. 此外, 对于实验结果的解释也不同, 一些人认为 DNA 双链断裂对低 LET 辐射的剂量响应为线性, 而有些人认为是非线性的^[5,6].

上述的工作一般是用活细胞或离体 DNA 水溶液作为实验材料的. 由于细胞富含水, 因此, 电离辐射对 DNA 的损伤同时存在直接作用和间接作用. 干燥实验样品的 DNA 辐射损伤应为直接作用的效应. 此外, 细胞的酶不但可修复 DNA 的碱基损伤和单链断裂, 而且能修复双链断裂. 为了研究 DNA 电离辐射原损伤的机制, 我们选用了干燥的 SINPV 作样品, 它具有病毒的普遍特征. 本文提出了分剂量段进行 20 h 和 40 h 两次电泳, 利用标准 DNA 将各段连接起来的方法, 达到较宽的剂量范围内有效分析 DNA 断裂的目的. 实验表明, SINPV 病毒的 DNA 链断裂 γ 辐射响应, 单链断裂是线性的, 而双链断裂为线性-二次曲线表示. 这可以用单靶一次击中和二次击中复合模型来描述, 单链断裂是一次击中效应, 而病毒 DNA 的双链断裂是一次击中和二次击中事件的共同效应, 其中二次击中事件效应为主.

关于 SINPV 辐射损伤, 已做了多方面的工作^[7,8]. 本工作是对 SINPV 的辐射的直接损伤产生的 DNA 链断裂进行分析和讨论.

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1994-10-08 曾蓉, 女, 25 岁, 1990 级硕士研究生

1 DNA 链断裂数测定原理

一个完整的线状 DNA, 若有一个双链断裂时, 就会形成两个片段. 所受的剂量越大, DNA 的断裂频率越大, 形成的片段数也越多, 平均分子量越小, 所以可以用平均分子量的变化来量度 DNA 断裂程度. 用凝胶电泳法就能把 DNA 的辐解片段按大小分离开来, 得出平均分子量.

Chen 等给出了用凝胶电泳法测量 DNA 链断裂的计算公式^[4]

$$\text{Breaks/DNA-Length} = Ln^{-1}(D) - Ln^{-1}(O) \quad (1)$$

式中 Ln^{-1} 为 DNA 平均分子量倒数, 其数学表达式为

$$Ln^{-1} = \int [\rho(m)/L(m)] dm / \int \rho(m) dm \quad (2)$$

式中 m 为 DNA 的迁移率, $\rho(m)$ 为某一迁移率下的 DNA 相对碱基含量, 由光密度表征, $L(m)$ 为此迁移率的 DNA 分子量. 关于某迁移率下的 DNA 分子量的大小由给出的公式确定, 即:

$$L(m) = C/(m - m_{\infty}) - C/(m_0 - m_{\infty}) \quad (3)$$

式中 m_0 为“0”长度分子的迁移率, m_{∞} 为“ ∞ ”长分子的迁移率, C 为与凝胶有关的常数, 这三个参数通过标准 DNA 的已知分子量与其对应的迁移位置经拟合计算求得. 本实验是以 SINPV-DNA 的 Pst I 酶切片段作为标准 DNA. 由于在电泳过程, 选用的电流很小 (5 mA), 各种大小的 DNA 分子在凝胶中的迁移速率很小, 因此可以认为 DNA 的迁移率与迁移距离成正比, 在实验中以迁移距离 X 代替迁移率 m . 所以 (3) 式可相应地改写为

$$L(X) = C/(X - X_{\infty}) - C/(X_0 - X_{\infty}) \quad (4)$$

完整的 SINPV-DNA 是超螺旋环状的, 在 DNA 提取过程中此结构会被破坏, 得到的大部分是松弛环状的. 由于环状分子有一个断裂点时, 分子变为线状, 而分子量不变. 所以用电泳法分析 SINPV-DNA 链断裂时, 为了使用上述公式, 把 Ln^{-1} 定义为线状 DNA 平均分子量的倒数. 在琼脂糖凝胶电泳中, 环状 DNA 的迁移率小于同样大小的线状 DNA 的迁移率, 因此在计算中作了简化处理, 即迁移率小于 146 kbp (Kb) (SINPV-DNA 的分子量) 的分子认为是环状 DNA. 对于单链断裂, 由于互补链上无断裂点, 在氢键的作用下 DNA 并不会断裂开来, 所以为了测出单链断裂, 必须先使 DNA 在碱性条件下双链解旋成单链, 用碱性电泳来分析单链断裂.

2 实验方法

2.1 样品制备

SINPV 样品为干粉制剂, 用塑料管包封, 置放在两块约 8 mm 厚的有机玻璃板中间, 实现辐照时的电子平衡. 样品在华南农业大学的 ^{60}Co γ 源上进行辐照, 剂量率约为 40 Gy/min, 剂量范围为 $1 \sim 1 \times 10^2$ kGy, 在室温下进行照射, γ 辐射场用 Frick 剂量计进行过标定. 辐照后, 用多角体裂解液 (0.1 mol/L NaCO_3 , 0.1 mol/L NaCl) 使病毒粒子 (核衣壳) 游离出来, 以 2000 r/min 离心 5 min, 上清以 16000 r/min 离心 15 min, 沉淀

病毒粒子. 用适量的 TE 缓冲液 (0.1 mmol/L Tris, 0.1 mmol/L EDTA, pH8.0) 悬浮病毒粒子, 加入等量的裂解缓冲液, 及适量蛋白酶 K (10 mg/mL), 充分混合后在 37°C 反应 30 min, 最后用饱和酚/氯仿 (1:1) 抽提一次, 便得到病毒 DNA 溶液. 在提取过程中, 将受不同剂量的 SINPV 样品各取 10 mg 装入 Eppendorf 管 (1.5 mL) 中进行分管同时处理, 这样可以减少由于实验条件不同而带来的误差.

未照的 SINPV 样品同样用上述方法提取 DNA, 再用饱和酚/氯仿 (1:1) 抽提一次, 在提取液中加入 1/10 体积的 0.3 mol/L NaAc, 2 倍体积无水乙醇 (-20°C) 使 DNA 脱水, -20°C 保持过夜. 以 16000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2~3 次, 吹风干燥, 得到干燥的 SINPV-DNA.

为了得到分子量大小已知的酶切 DNA 片段, 将上述方法提取的 DNA, 用无菌三蒸水溶解, 加入酶切缓冲液和限制性内切酶 Pst I, 在 37°C 下反应 4 h, 再经 65°C 的水浴 15 min, 样品在 4°C 保存备用.

2.2 琼脂糖凝胶电泳

取一定量经不同剂量辐照的病毒提取的 DNA, 分别与样品混合液混匀, 在 0.8% 中性琼脂糖凝胶板上和标准分子量的 SINPV-DNA 的酶切样品同时电泳. 为了分析 DNA 的单链断裂, 需将双链 DNA 用碱性解旋法解旋成单链.

电泳后, DNA 用溴化乙锭 (EtBr) 染色. 与 DNA 共价结合的 EtBr 在 280 nm 的紫外光作用下可发出可见波长的荧光, 荧光经乳胶片感光转换为光密度. 仔细地选择曝光时间、冲洗时间, 荧光光强可以线性地转换为光密度, 所以 DNA 相对碱基含量可以由光密度表征. 在紫外光下拍取电泳结果. 用 9 W 型测微光度计测量底片上的光密度, 经校正后, 得到 DNA 迁移位置与相对光密度的分布. 经碱性和中性琼脂糖凝胶电泳光密度分布如图 1 所示.

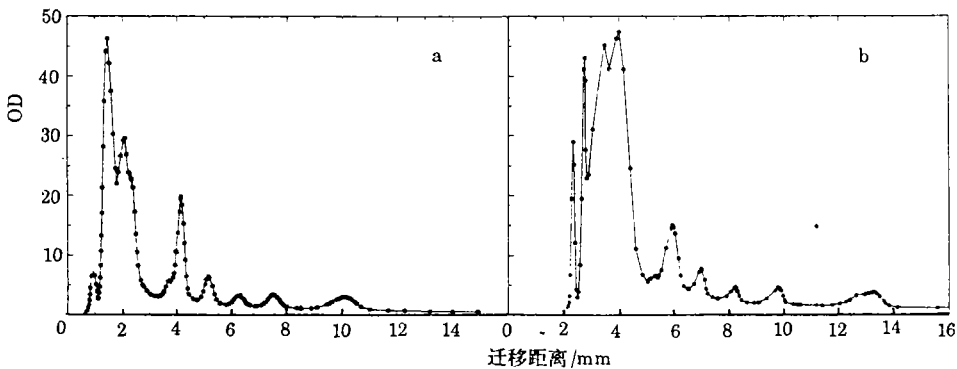


图 1 SINPV-DNA 的 Pst I 酶切碱性 (a) 和中性 (b) 电泳紫外照片的光密度分布图

Fig. 1 Optical density distribution obtained by alkaline (a) and neutral (b) agarose gel electrophoresis for SINPV-DNA cleaved restriction enzyme Pst I

3 结果和讨论

3.1 DNA 相对碱基含量与光密度的关系

一般 DNA 碱基含量和与其结合的 EtBr 在紫外光中发出的荧光光强是成正比的. 但荧光光强转换为光密度是否线性, 即 DNA 相对碱基含量与光密度的线性关系, 应通过实验来检验. 由于 SINPV-DNA 为环状, 用限制性内切酶酶切后产生的不同大小分子片段的数目是相同的, 如果各片段分子量大小已知, 与其对应的光密度峰值进行比较, 可检验 DNA 含量与光密度是否线性. 图 2 可看出中性琼脂糖凝胶电泳的紫外照片中, DNA 相对碱基含量与光密度成线性关系, 并且其他各电泳带的光密度大小均在所检验的范围内, 所以本实验的 DNA 相对碱基含量测量是可靠的.

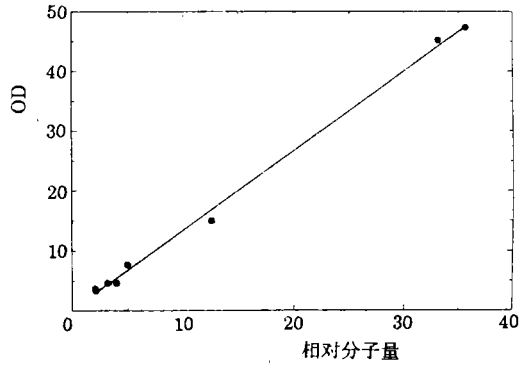


图 2 标准 DNA 相对碱基含量与已校准的光密度的关系

· 表示碱性电泳的实验数据, 直线表示最小二乘法拟合结果

Fig. 2 Optical density vs. relative molecular weight for standard DNA

3.2 DNA 分子量的测定

琼脂糖凝胶电泳中, DNA 分子量的定量可通过 (3) 式进行, 式中待定常数 C , X_0 , X_∞ 用最小二乘法拟合 SINPV-DNA 的酶切片段的的标准 DNA 分子量及对应的迁移位置得出. 酶切片段的分子量和对应的迁移位置的拟合结果如下: 对于碱性电泳 $C=24.32$ ($\text{kb} \cdot \text{mm}$), $X_0=53.83$ (mm) 和 $X_\infty=0.73$ (mm); 对于中性电泳 $C=29.15$ ($\text{kb} \cdot \text{mm}$), $X_0=40.16$ (mm) 和 $X_\infty=2.56$ (mm). 因此, DNA 分子量 $L(X)$ 与其迁移距离的关系为:

$$L(X)=24.32/(X-0.73)-0.46 \quad (\text{碱性电泳}) \quad (5)$$

$$L(X)=29.15/(X-2.56)-0.78 \quad (\text{中性电泳}) \quad (6)$$

式中 $L(X)$ 的单位为 kb 或 kbp , X 为 mm .

3.3 SINPV-DNA 的链断裂测定

SINPV 经不同 γ 剂量照射, 病毒 DNA 的断裂频率不同, DNA 的分子量分布也不同. 凝胶电泳方法就是利用已校准的光密度谱, 即分子量分布谱, 把这种不同的分子量分布测定出来. 利用公式 (1), (2), (5) 和 (6) 可计算出病毒 DNA 单链和双链的断裂频率, 即每 146 kb 单链 DNA 的链断裂数 (SSB/146 kb), 或每 146 kbp 双链 DNA 断裂 (DSB/146 kbp).

由 $L(X)$ 关系可知, 经 40 h 电泳, 小于 1 kbp (1 kb) 的 DNA 片段可能移出胶体外, 会影响大剂量的结果, 因为病毒 DNA 受大剂量照射时链断裂频率大, 形成的小片段数目多, 影响大剂量的断裂测量结果的可靠性, 因此需要进行第二次时间为 20 h 的电泳. 两次电泳所用的凝胶浓度一致, 电压和电流不变, 不同的只是电泳时间. 对两次电泳的

酶切谱进行比较发现 DNA 的两块胶上的迁移位置具有一一对应关系. 如果设电泳 40 h 后某一大小的 DNA 的凝胶中迁移位置为 X_t , 电泳 20 h 后, 此 DNA 的迁移位置为 $X_{t/2}$, 经最小二乘法拟合, 得出如下关系

$$X_t = -6.40 + 1.05X_{t/2} + 0.05(X_{t/2})^2 \quad (\text{碱性电泳}) \quad (7)$$

$$X_t = 0.51 - 0.43X_{t/2} + 0.18(X_{t/2})^2 \quad (\text{中性电泳}) \quad (8)$$

这样可用此公式, 把短时间电泳后的 DNA 迁移位置 $X_{t/2}$ 转换为长时间电泳后相应的迁移位置 X_t , 同样用公式 (1), (2), (5) 和 (6) 计算出 DNA 的断裂频率. 图 3 示出不同剂量辐照后, 20 h 中性电泳紫外照片的光密度谱.

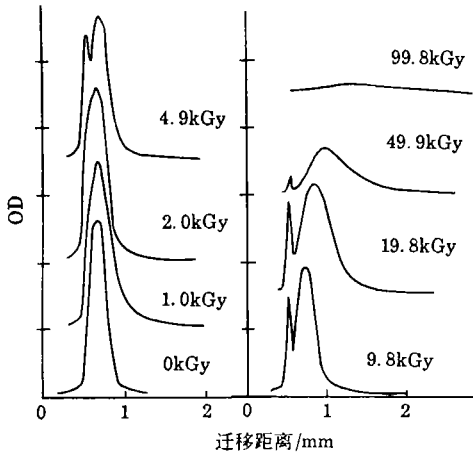


图 3 SINPV - DNA 经不同剂量照射后 20 h 中性电泳紫外照片的光密度

Fig. 3 Spectra of optical density measured for photographs which were obtained by neutral agarose gel electrophoresis for SINPV - DNA samples 20 hr after irradiating at different dose levels

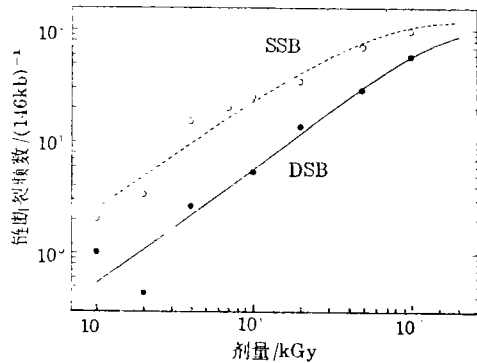


图 4 SINPV - DNA 链断裂的频数与吸收剂量的关系

Fig. 4 The strand breaks frequency vs. absorbed dose for SINPV - DNA

3.4 SINPV - DNA 链断裂的剂量响应

Luo^[8]等曾以靶理论为基础, 提出一个描述病毒存活率与辐射剂量关系的模型, 用于描述 DNA 的辐射损伤, 可作如下假设: ① 辐射对病毒作用的关键靶是病毒 DNA; ② 病毒 DNA 上只要有一个双键断裂便会使病毒失去感染力, 并称之为病毒失活; ③ DNA 双键断裂的形成有两种方式: DNA 的双键由于一个电离事件而断裂; DNA 的两条键的断裂分别由两个无关联的电离事件引起, 而且这两个断裂点的空间位置足够近. 前一种方式为“一次击中”过程, 后一种为“二次击中”过程. 如果在一条完整的 SINPV 的 DNA 总共有 N_0 个靶, 某剂量下的相对响应, 即双键断裂数为 $N(D)$, 则

$$N(D) = N_0 \{ R(1 - e^{-D/D_0}) + (1 - R)[1 - (1 + D/D_0)e^{-D/D_0}] \} \quad (9)$$

上述公式中 R 为一次击中事件占总事件的分额, 称为一次击中因子. D_0 为特征剂量. 这

就是用于描述病毒剂量响应一次和二次击中复合模型.

用(9)式拟合实验数据,结果由图4给出,DNA单链断裂(SSB)所得到的拟合参数为, $N_0=120.0$ (SSB/146 kb), $D_0=47.8$ (kGy),和 $R=0.99$.在1~100 kGy的剂量范围内,实验数据用单靶一次击中和二次击中复合模型拟合,得出 $R=0.99$,说明单链DNA上断裂是一次击中事件的效应.

用(9)式拟合得出DNA双链断裂(DSB)的特征参数为 $N_0=102.1$ (DSB/146 kbp), $D_0=65.7$ (kGy),和 $R=0.34$.用一次和二次击中复合模型拟合实验数据, R 的拟合值为0.34,说明DNA双链断裂是一次和二次击中事件的效应.对于 γ 来说,由二次击中引起的效应占大部分.由于采用公式(9)特征剂量较大,要达到饱和效应需要大的辐射剂量,所以在一般的实验中DNA双链断裂与剂量成线性二次关系,观察不到饱和效应.总之,本实验结果反映了DNA双链断裂剂量响应是非线性响应.由于DNA在所研究的病毒系统中辐射损伤后不会被修复,因此响应的非线性并不是DNA酶修复的作用.

比较单链和双链断裂频率的剂量响应,便可发现随着剂量增大,两类链断裂频率的差距减小,饱和值更相差无几.说明随着剂量增大,由两个单链断裂形成一个双链断裂的几率增大,这也表明 γ 辐射诱发DNA链断裂时,存在二次击中事件.

参 考 文 献

- 1 Olive P L, Hilton J, Durand R E. DNA conformation of Chinese hamster V79 cells and sensitivity to ionizing radiation. *Radiat Res*, 1986, 107: 115
- 2 Blocher D. Dose response in neutral filter elution. *Radiat Res*, 1990, 123: 176
- 3 Okayasu R, Iliakis G. Linear DNA elution dose-response curves obtained in CHO cells with non-unwinding filter elution after appropriate selection of the lysis conditions. *Int Jour Radiat Biol*, 1989, 55: 569
- 4 Chen C Z, Southern E M. Gel electrophoresis method for quantitation of gamma ray induced single- and double-strand breaks in DNA irradiated in vitro. *Electrophoresis*, 1989, 10: 318
- 5 Okayasu R, Iliakis G. The shape of DNA elution dose-response curves under non-denaturing conditions: the contribution of the degree of chromatin condensation, 1992. *Int J Radiat Biol*, 1992, 61: 455
- 6 Blocher D. DNA double-strand break repair determines the RBE of a particles. *Int Jour Radiat Biol*, 1988, 54: 761
- 7 李冕丰, 罗达玲, 张纯祥, 等. 斜纹夜蛾病毒对 γ 和e的响应. *核技术*, 1992, 15: 59
- 8 Luo Daling, Li Mianfeng, Bai Yin, et al. Study on radiation effects of SINPV exposed to ionization radiations. *Radiat Prot Dosim*, 1994, 52: 225

Radiation Damage of SINPV Irradiated by Gamma Rays

Zeng Rong* Wang Xunzhang Zhang Chunxiang Luo Daling Li Mianfeng

Abstract The SINPV samples in dry powdered form sealed in plastic tube were irradiated by 1~100 kGy wide dose range gamma rays. The single strand breaks (SSB) and double strand breaks (DSB) induced in SINPV after irradiation were measured using neutral and alkaline agarose gelelectrophoresis for 20 hours and 40 hours separately. The molecular length distribution of DNA can be measured by comparing average molecular length of DNA before and after irradiation and by comparing with the mobility of DNA size marker in an adjacent gel lane so that the frequency of SSBs and DSBs induced by gamma rays can be determined quantitatively. A dose - response function which combines the responses of one - hit and two - hit events was used to describe SSB and DSB dose - response curves. By fitting to the experimental data, R and D_0 were obtained. R is equal to 0.99 for SSB and 0.34 for DSB. It is shown that the SSB are one - hit events and the DSB are due to the contribution of both one - hit and two - hit events, and two - hit events are predominant in the DSB process.

Keywords Spodoptera litura Nuclear Polyhedrosis Viruses (SINPV), DNA single and double strand breaks, Gamma radiation

* Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275