随机断裂模型对 ^7Li 离子致 DNA 链断裂 碎片长度分布的分析

孔福全 赵葵 展永 曹天光 倪媚楠 隋丽
蔡明辉 卓益忠

(中国原子能科学研究院, 北京 102413; 河北工业大学理学院, 天津 300130; 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. E-mail: fqkong@iris.ciae.ac.cn)

摘要 用随机断裂模型分析了重离子电离辐射致质粒 DNA 双链断裂(dsb)的片段长度分布, 随机断裂模型中的 u 为平均每个 DNA 上的双链断裂数, 并可直接由实验得到. 分析表明在低剂量时, 随机断裂模型都不能描述 DNA 的碎片分布. 在较高剂量时, 随机断裂模型可以较好地符合实验结果, 说明了在较大剂量情况下, 重离子诱发的 DNA 碎片的长度分布具有随机统计性质.

关键词 重离子 质粒 DNA 双链断裂 随机断裂模型 电离辐射

DNA 作为生物体中的一类基本生物大分子, 是离子辐射引致生物效应的关键靶分子. 电离辐射可引起多种类型的损伤, 如碱基变化、糖基损伤、单链和双链断裂(dsb)以及 DNA 和蛋白质的交联等^[1]. 其中 dsb 是辐射所致生物效应中最重要的原初损伤, 非重接性的 dsb 则被认为是细胞杀伤效应的最重要的损伤. 特别是高 LET 的重离子更容易诱发 DNA 的非重接性双链断裂, 导致明显的生物效应.

目前有很多的实验方法可对电离辐射诱发的 DNA 双链断裂形成的不同大小的分子碎片进行检测, 如中性梯度沉降、中性过滤淘析、凝胶电泳、早期染色体凝缩和电子显微镜等. 但是, 每种方法都有其适用范围和局限性, 不同程度地存在着一些灵敏性以及物理基础不清楚等问题. 近来的一些研究还证实, 所使用的测量 dsb 的技术低估了 dsbs 的产额.

近几年发展起来的原子力显微镜(AFM)使分辨率达到了几个纳米的高水平, 它可以观测到单个的 DNA 分子及几十个碱基对(bp)的小片段, 使得观测到的片段分布更加精确, 从而使数据统计误差变得更小. 而且这种技术的物理基础清楚, 样品制备也简单. 1996 年 Pang 等^[2]首先用 AFM 成功地观察到 18 MeV 的电子诱发的 DNA 的双链断裂. 随后, 他们又利用同样的方法研究了中子诱发的 DNA 损伤及碎片长度分布, 为成团的 DNA 双链断裂提供了实验证据^[3].

2002 年, 日本辐射生物科学研究所的一个小组用 AFM 研究了 ^{60}Co 的 γ 射线诱发的 DNA 损伤^[4], 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情况. 近来, 隋丽等则利用 AFM 观测到了重离子致 DNA 形态的变化并测量了 DNA 碎片长度随剂量变化的分布^[5].

随着研究的深入, 辐射致 DNA 双链断裂的机制越来越被人们所关注. 研究表明 dsb 的分布与染色体的几何结构、离子的线性能量转移(linear energy transfer, LET)及其辐射径迹结构等相关^[6]. 要阐明观察到的片段分布需建立模型. 2000 年 Newman 等^[7]用随机断裂模型^[8]对 X 射线和 α 粒子致细胞单层、核酸单层的 DNA 片段分布进行分析, 发现理论计算与实验符合的都不好. Rainer 等将随机断裂模型进行改进, 发展了集团断裂模型^[9], 并用这两个模型分别对 Löbrich 的被氮离子辐射后纤维原细胞的 DNA 片段分布数据^[10]和 Newman 的被 α 离子辐射后中国仓鼠 V79 细胞的 DNA 片段分布数据^[11]进行分析, 表明了在有复杂结构的染色体被辐照后的 DNA 片段分布的分析中, 集团断裂模型比随机断裂模型更好的与实验数据相符合.

但是, 以前模型所分析的 DNA 片段分布均是对具有复杂结构的染色体辐射后通过凝胶电泳技术得到的, 使用的脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术可以检测几千碱基对(kbp)到几百万碱基对(Mbp)的片段, 一些很小的片段被遗漏, 使得测量误差加大. 同时(另外), 染色体的复杂结构也使得辐射产生的 dsb 复杂化, 其中还可能存在着多损伤位点和集团断裂. 并且在此基础上建立的模型如集团断裂模型, 所考虑的反应

过程都是比较复杂的作用过程,这对于简单的质粒是不适合的.总之,分析DNA双链断裂的片段分布的理论还在发展之中.

本文尝试用随机断裂模型^[8]对重离子 ^7Li 致DNA双链断裂的碎片长度分布进行分析,由于所用的质粒DNA样品结构简单,使得辐射诱发的反应也变得相对简单,加以AFM观测的统计准确性,期望能够再现重离子辐射致DNA双链断裂的实验结果.

1 DNA辐照实验及碎片的长度分布数据

1.1 DNA辐照实验及其参数

隋丽等人^[5]利用中国原子能科学研究院HI-13串列加速器产生的26 MeV的 ^7Li 重离子对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 μm 厚的Kapton薄膜、1.5 cm的空气层和2.5 μm 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.离子到达样品表面时的能量为18 MeV,在水中的LET值为124 keV/ μm ,在水中的射程为91 μm .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2, 4, 6, 8和10 Gy.样品为pGEM-T1质粒DNA,由军事医学科学院放射医学研究所放射毒理实验室构建.所用DNA的原始长度大约为4500 bp,结构比较简单,主要为超螺旋与开环.

1.2 实验结果

利用AFM对不同剂量 ^7Li 离子辐照后的DNA样品中的碎片长度进行了统计测量,得到了样品中DNA碎片长度的分布.图1给出了碎片长度与其所占比例的直方图,其中(a)~(e)分别是经2, 4, 6, 8和10 Gy剂量辐照后的样品中DNA碎片长度的分布函数.由图1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10 Gy时,碎片的长度只在0~750 nm之间分布.而且,从图中还可以看到,随着剂量的增加,短碎片区域逐渐出现了明显的峰,而且,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.

图1 ^7Li 离子辐照后DNA样品中碎片的长度分布

1.3 DNA 碎片的长度分布数据

图 1 中各个剂量点下的 DNA 碎片长度分布的实验数据如表 1 所示. 表 1 中第一列给出的是一个 DNA 片段区间的最小长度 L_1 , 单位 bp; 第二列给出的是片段区间的最大长度 L_2 ; 第三列给出的是片段区间的平均相对长度, 即 $(L_1+L_2)/2S$, S 为 DNA 原始长度. 最后五列分别是剂量 2, 4, 6, 8 和 10 Gy 时的片段的数量百分数. AFM 检测出来的是单位为 nm 的片段长度, 在与碱基对的转换中采用了 3 bp = 1 nm. 表中的空白项为零.

2 理论分析

2.1 随机断裂模型

随机断裂模型于 1991 年由 Cook 和 Mortimer 建立 [8], 它是为了描述脉冲场凝胶电泳和 Southern 杂交实验. 杂交探针的长度小于最小的 DNA 片段的长度. 基于实验特点, 作了如下的三个假设:

假设 1 在整个基因上, 双链断裂是等几率的, 并且与前一个断裂的位置无关. 这种假设忽略了可能由二次电离径迹和沿主径迹的多事件产生的集团断裂; 这样, 可以用泊松分布描述双链断裂数的分布, 用 “broken-stick” 分布描述给定断裂数的片段分布. 对于原始长度为 S 、有 n 个断裂的 DNA 片段 x 的分布为

$$\frac{n}{S} \left[1 - \left(\frac{x}{S} \right) \right]^{n-1}; \quad (1)$$

假设 2 探针标记的只有一个断裂点的 DNA, 这个片段即为探针所在的地方;

假设 3 每一个探针标记的片段对于损伤密度的贡献是均等的.

长度为 S 的 DNA 被杂交位点分为两部分. 我们将左边较小的部分定义为 S_L , 右边较长的部分定义为 S_R , $S_L + S_R = S$, 假设每个 DNA 上平均有 u 个 DSB, 左边有 i 个断裂, 右边有 j 个断裂. 被标记的长度为 x 的片段的几率 $F(x)$ 可通过三个假设得到.

从第一个假设可以得出, i 与 j 的取值几率可由泊松分布得出. 定义 $f_L = S_L/S$, $f_R = S_R/S$, 则 i 与 j 的几率为

$$\frac{(uf_L)^i e^{-uf_L}}{i!} \cdot \frac{(uf_R)^j e^{-uf_R}}{j!}, \quad (2)$$

将上式化简为

$$e^{-u} \frac{(uf_L)^i (uf_R)^j}{i! j!}, \quad (3)$$

由此可得到随机断裂片段分布:

$$I_{n(x)} = \frac{u}{S} \left(2 + u - \frac{ux}{S} \right) \cdot \exp \left(-\frac{ux}{S} \right). \quad (4)$$

式中: $I_{n(x)}$ 为长度为 x 的片段的数量. x 为片段长度. u 为平均每个 DNA 上的双链断裂数, 是惟一的参数, 可由实验提供. S 为 DNA 的原始长度.

2.2 理论分析

在随机断裂模型中, 每个剂量点的 u 值由实验直接得到, 即用 DNA 原始长度 S 除以各个剂量点的全部 DNA 片段的平均长度, 即 $u = S / \left[\left(\sum_{i=1}^N x_i \right) / N \right]$, 式

表 1 DNA 片段长度分布

$L_1(\text{bp})$	$L_2(\text{bp})$	相对长度	% (数量)/剂量点				
			2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
150	450	0.0667	0.058	0.137	0.07327	0.17589	0.293
450	750	0.133	0.039	0.088	0.07283	0.13541	0.266
750	1050	0.2	0.02	0.1	0.0724	0.10989	0.193
1050	1350	0.267	0.01	0.059	0.07197	0.09235	0.11
1350	1650	0.333	0.01	0.03	0.07154	0.07957	0.046
1650	1950	0.4		0.02	0.07111		0.037
1950	2250	0.467	0.069	0.029	0.07069	0.06221	0.037
2250	2550	0.533	0.039	0.03	0.07027	0.05605	
2550	2850	0.6	0.04	0.04	0.06985	0.05098	
2850	3150	0.667	0.069	0.02	0.06944	0.04674	
3150	3450	0.733	0.068	0.088	0.06903	0.04314	
3450	3750	0.8	0.049	0.138	0.06862	0.04005	
3750	4050	0.867	0.147	0.088	0.06822	0.03736	
4050	4350	0.933	0.196	0.118	0.06781	0.03501	
4350	4650	1	0.137	0.079			

中 x_i 为实验中观测到的第 i 个片段的长度, N 为观测的总片段数, 不同剂量下的实验 u 值均列于表 2.

表 2 各个剂量点下的 u 值

剂量	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
u 值	1.414	1.727	1.897	2.642	5.49

计算结果见图 2, 横坐标表示的是平均相对长度, 正如表 1 中第 3 列所示. 图中 B 为实验数据, 误差棒为 10%, 主要来自数目的统计误差. D(即实线)表示的数据是将实验 u 值代入公式(4)中得到的.

3 讨论

由图 1 可以看出, DNA 片段随着剂量的分布经历了一个从 2 Gy 与 4 Gy 时长片段占较大比例, 6 Gy 时片段分布较平均, 到 8 Gy 与 10 Gy 时, 短片段占较大比例的过程, 即随着剂量的增加, DNA 碎片变得越来越短. 在剂量为 6 Gy 时, 在各个片段范围内的实验数据彼此起伏不大, 可称为是一个转折点. 由图 2 中曲线 D 可以清楚的看出, 在低剂量 2 Gy 和 4 Gy 时, 曲线 D 与实验数据相差较大. 在剂量为 6 Gy 时, 曲

图 2 随机断裂模型对 ^7Li 致 DNA 链断裂碎片的长度分布的拟合

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972004-827>

线 D 与实验数据符合的稍好一些, 仍差得较远. 在较高剂量 8 Gy 与 10 Gy 时, 曲线 D 与实验数据越来越接近. 即使把 u 看成一个自由参数, 同样存在着在低剂量时符合不好, 而高剂量时符合得较好的趋势. 总之, 在较高剂量时, 随机断裂模型可以较好地符合实验结果, 说明了在较大剂量情况下, DNA 碎片分布具有随机统计性质. 可以说, 在这种情况下, 随机断裂模型是没有可调参数的, 因为 u 值有明确的物理意义, 并可直接由实验得到. 而在低剂量时, 无论怎样调节参数 u , 在随机断裂模型的框架内都不能描述 DNA 的碎片分布情况.

在低剂量时, 由于离子数量比较少, 离子径迹与 DNA 发生反应的几率较小, DNA 与离子的相互作用就不仅仅是简单的随机统计问题. 随着剂量的逐步增大, 离子数的增多, 离子径迹与 DNA 反应的几率增加, 出现了 6 Gy 时的转折点; 剂量继续增大, 离子数越来越多, DNA 碎片长度的分布逐渐出现了随机统计性, 此时断裂点及碎片长度逐渐呈现出随机分布的规律. 所以随机断裂模型在低剂量时与实验结果符合得很差, 而到了高剂量时就符合的很好了. 因而, 若要符合低剂量的实验结果, 可能要考虑 DNA 空间关联以及存在的敏感损伤位点等物理因素, 跳出随机断裂模型的框架, 建立新的理论模型. 这是我们的实验结果及其分析对理论提出的一个挑战.

4 结论

通过随机断裂模型对 ^7Li 离子致质粒 DNA 链断裂的片段长度分布分析可以看出, 在较高剂量时, 随机断裂模型能较好地拟合实验结果, 在低剂量时, 随机断裂模型无论如何是不能描述 DNA 链断裂的片段长度分布的. 此时, DNA 的片段长度分布是不符合泊松分布的. 因而, 若要符合低剂量的实验结果, 可能要建立与泊松分布互补的分布, 或者考虑 DNA 的空间关联等, 建立新的理论模型.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 10175095, 10435020)和中国原子能科学研究所所长基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 杨垂绪, 梅曼彤. 太空放射生物学. 广州: 中山大学出版社, 1995. 23 ~ 24
- 2 Pang D, Popescu. G, Rodgers J, et al. Atomic force Microscopy investigation of radiation-induced DNA double Strand breaks. *Scanning Microscopy*, 1996, 10(4): 1105 ~ 1110
- 3 Pang D, Berman B L, Chasovskikh S, et al. Investigation of neutron-induced damage in DNA by atomic force microscopy: experimental evidence of clustered DNA lesions. *Radiation Research*, 1998, 50: 612 ~ 618
- 4 Boichot S, Fromm M, Cunniffe S, et al. Investigation of radiation damage in DNA by using atomic force microscopy. *Radiation Protection Dosimetry*, 2002, 99(1-4): 143 ~ 145
- 5 隋丽, 赵葵, 倪嵛楠, 等. ^7Li 和 ^{12}C 离子致 DNA 链断裂的研究. *高能物理与核物理*, 2004, 28(10): 1126 ~ 1130
- 6 Brenner D J. Track structure lesion development and cell survival. *Radiation Research*, 1990, 124: 29
- 7 Newman H C, Prise K M, Michael B D. The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-ray or α -particles. *INT J Radiat Bio*, 2000, 76(8): 1085 ~ 1093[DOI]
- 8 Cook V E, Mortimer R. A quantitative model of DNA fragments generated by ionizing radiation and possible experimental applications. *Radiation Research*, 1991, 125: 102 ~ 106
- 9 Rainer K S, David J B, Philip J H, et al. A formalism for analyzing large-scale clustering of radiation-induced breaks along chromosomes. *INT J Radiat Bio*, 1998, 74(2): 185 ~ 206[DOI]
- 10 Löbrich M, Cooper P K, Rydberg B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *INT J Radiat Bio*, 1996, 70(5): 493 ~ 503[DOI]
- 11 Newman H C, Prise K M, Folkard M, et al. DNA double-strand break distribution in X-ray and α -particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage. *INT J Radiat Bio*, 1997, 71(4): 347 ~ 363[DOI]

(2004-12-21 收稿, 2005-02-04 收修改稿)