

低能氮离子束注入固态5'-dTTP的 辐照损伤研究*

邵春林 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

摘要 对30keV氮离子束辐照5'-dTTP核苷酸引起的无机磷和碱基的释放进行了多方面的研究, 得到无机磷产率和碱基产生量的剂量效应曲线, 以及0.1mol/L NaOH碱处理对它们的影响。碱处理不仅增加了无机磷的释放量, 而且还使辐照产生的游离碱基受到损伤而裂解。碱处理后立刻测量得知, 受辐照样品的碱溶液中无机磷的含量为其水溶液中的1.7倍, 而样品碱溶液中的碱基浓度却只有其水溶液中的0.5倍左右, 碱处理40min后, 受辐照样品之碱溶液中无机磷含量则增至其水溶液中的2.8倍左右。另外, 离子束辐照作用主要是直接作用, 具有较高的 $G(\text{Pi})$ 值, 达0.44分子/100eV以上。

关键词 离子束辐照, 5'-dTTP, 无机磷释放, 碱基释放, 碱处理

作为一种新的诱变手段, 低能离子束诱变存在着比 γ 射线等电离辐射诱变更为深刻的机制, 它不仅拥有电离辐射的能量作用过程, 而且已被证实还具有离子注入这一质量沉积效应^[1-3], 这使其具有广泛的发展前景。在探索低能离子束诱变机理方面, 人们对生物体的染色体畸变、DNA的损伤^[4,5]等已进行了一定的研究。染色体畸变和DNA损伤都基于它们的基本组成单位——核苷酸中碱基的损伤和磷酸戊糖键的断裂。碱基的损伤能导致DNA遗传密码的改变, 而磷酸戊糖键的断裂则直接引起DNA链的断裂^[6], 两者都对基因突变起着重要作用。

在辐射后处理上, 强碱处理已成为一种重要方法。由于核苷酸受到辐射后能产生不稳定性磷酸酯, 该酯在强碱的处理下分解产生无机磷, 因此受辐射的核苷酸在碱处理后可较大地增加无机磷的释放量^[7]; 而用强碱处理受到电离辐射的DNA, 则可增加链的断裂数^[8]。本文将着重报道离子束辐照后的固态5'-dTTP, 其分子损伤后无机磷和碱基产生量的剂量效应以及碱处理对它们的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

5'-dTTP为Sigma公司产品, 其 $\text{OD}_{280}/\text{OD}_{260} = 0.73$, 使用前没有进一步纯化处理。其余试剂均为分析纯。

1.2 辐照源

氮离子束由本所离子束育种机产生。离子束能量为30keV, 采用脉冲式辐照, 每次脉冲

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1993-10, 修回日期: 1994-03-21

10s, 束流30mA。每次脉冲辐照到样品上的离子剂量为 10^{15} ions/cm²。

1.3 方法

将一定质量的样品溶于水后铺于载玻片上, 样品面积约3.5cm²。将样品45℃干燥后, 进行离子束辐照。将辐照前后的样品以5ml H₂O或5ml NaOH洗涤, 收集洗液, 分别即刻和在碱处理40min后用磷钼酸法在660nm处测样品中无机磷含量。

已知 5'-dTMP水溶液的 $\lambda_{\max}=269\text{nm}$ ($\epsilon=9900$), 而在 0.1mol/L NaOH中, 其 $\lambda_{\max}=267\text{nm}$ ($\epsilon=7350$); 5'-dTMP辐解产物T在水溶液中的 $\lambda_{\max}=264.5\text{nm}$ ($\epsilon=7890$), 在 0.1mol/L NaOH溶液中的 $\lambda_{\max}=291\text{nm}$ ($\epsilon=5440$)。因此要了解碱基产生量的情况, 可用 753WB紫外可见分光光度计分别对离子束辐照后的 5'-dTMP水溶液在264.5、269nm处测其紫外吸收值, 而对其碱溶液则在267、291nm处测紫外吸收值。

2 结果与分析

2.1 离子束辐照后5'-dTMP的无机磷产率

在低剂量时, 5'-dTMP经离子束辐照后产生的无机磷分子数占样品中总磷分子数的摩尔百分比($S(P_i)$), 随辐照剂量呈非线性增长关系; 但当离子剂量大于 10×10^{15} ions/cm²时, $S(P_i)$ 与离子剂量呈线性关系(如图1)。另外, $S(P_i)$ 还与样品的质量有关: 质量大的样品, 无机磷产率较高, 即注入离子能更好地与靶分子作用, 这意味着离子束的射程大于实验中所用样品的厚度。

在本实验的离子剂量范围内, 由 $S(P_i)$ 得到的 $G(P_i)$ 值(每吸收100eV能量, 5'-dTMP所能释放的无机磷分子数)随剂量增加而减小至一稳定值(0.44), 即离子束辐照5'-dTMP时, 其 $G(P_i)>0.44$ 。这不同于 γ 射线辐射处于液体体系中的5'-dTMP时 $G(P_i)$ 值随剂量增大而增大的结果^[9]。

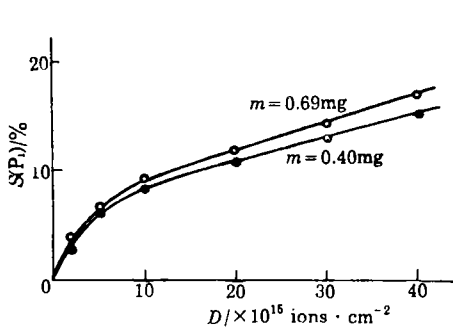


图1 氮离子束辐照不同质量5'-dTMP所释 $S(P_i)$ 的剂量效应

Fig.1 The fluence effects of the percentage $S(P_i)$ of inorganic phosphate in total phosphate released from different amount of 5'-dTMP irradiated by N^+ ion beam

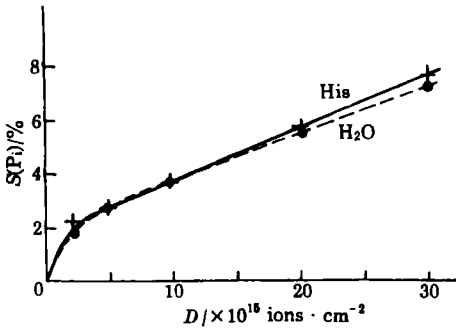


图2 离子束辐照后样品在水和2mmol/L组氨酸溶剂中的释磷曲线

Fig.2 The capacity of releasing inorganic phosphate from 5'-dTMP irradiated by ion beam in water and in 2mmol/L histidine solution

将离子束辐照后的5'-dTMP样品溶于2mmol/L组氨酸(His)溶液中, 测得的无机磷释放量与辐照后样品在水溶液中的无机磷释放量相一致(如图2), 说明组氨酸对辐照后5'-dTMP样品的释磷没有影响。由于组氨酸能有效地清除OH自由基^[9], 该自由基是液体系统中导致

辐射释磷的主要因素, 因此图2所示表明, 离子束辐照后的固态5'-dTMP溶于含水溶剂中时, 溶液中不会含有OH自由基, 因而无机磷的产生完全是离子束直接作用的结果。

2.2 0.1mol/L NaOH处理后的无机磷释放量

离子束辐照后的5'-dTMP样品经0.1mol/L NaOH处理后, 无机磷的释放量大大增加。图3表明碱处理后立刻测量, 样品碱溶液中无机磷含量仅为其水溶液中的0.7倍左右;而碱处理40min后碱液中无机磷含量约增至样品水溶液中无机磷含量的2.8倍。也就是说, 同样是碱处理, 无机磷的释放量随碱处理时间的增加而增加, 这与Ward等研究3'5'-dTMP得到的结果相一致^[10], 虽然增加的幅度不同(见后)。当然, 碱处理后无机磷的增加也不是无限制的, 它受到一定剂量下离子束辐照所能产生的碱不稳定性磷酸酯量及总磷量的限制, 碱处理一定的时间后, 无机磷的释放量将达到一极大值。

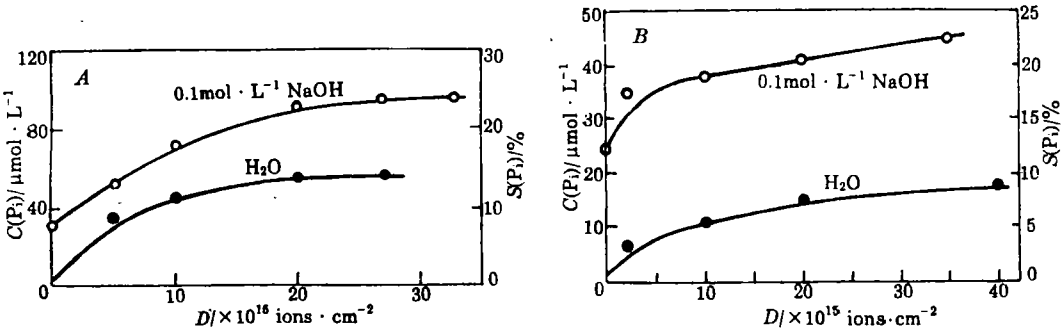


图3 不同剂量离子束辐照后的样品溶于水及经0.1mol/L NaOH碱处理不同时间的无机磷浓度 $C(P_i)$ 及其占总磷量的摩尔百分数 $S(P_i)$

A. $m = 0.64\text{mg}$, $C = 0.4\text{mmol/L}$, 溶解后立即测; B. $m = 0.32\text{mg}$, $C = 0.2\text{mmol/L}$; 溶解后40min测

Fig.3 The concentration $C(P_i)$ of inorganic phosphate and the percentage $S(P_i)$ of inorganic phosphate in total phosphate. The samples irradiated by ion beam with different fluence were dissolved into water and 0.1mol/L NaOH solution respectively

A. $m = 0.64\text{mg}$, $C = 0.4\text{mmol/L}$, measurement taken immediately after the dissolution; B. $m = 0.32\text{mg}$, $C = 0.2\text{mmol/L}$ Measurement taken 40min after the dissolution

2.3 碱基的产生与裂解

电离辐射将会使5'-dTMP释放出碱基T, 利用碱基T所具有的特征紫外吸收可计算碱基的产生量及碱处理对它的影响。

将辐照前后的样品分别以5ml H_2O 和5ml NaOH洗脱, 取2ml洗液稀释至6ml作紫外吸收测量, 对 H_2O 和NaOH分别在不同波长处测OD值, 根据Beerio-Lamberti定律, 可以计算出离子束辐照后, 在不同洗液中5'-dTMP的相对残余活性 $S(\text{dTMP})$ 及辐照所产生的碱基量 $C(T)$ 的剂量效应(如图4)。由图4可见, 离子束辐照引起的碱基释放量随离子剂量的增大而逐渐趋于某极大值, 并且当剂量进一步增大时, 碱基量有减少之趋势。这是因为, 一定质量的5'-dTMP样品所能释放出的碱基量是有限的。低剂量时, 注入离子与5'-dTMP充分作用, 并使之释放出碱基, 此时碱基的产生量随剂量增大而增加;但随着剂量的进一步增大, 可损伤的5'-dTMP分子数逐渐减少, 它所能释放的碱基量也逐渐减少;然而在离子束辐照下, 从5'-dTMP中释放出来的碱基的损伤量则是随剂量的增大而增多, 结果, 在一定剂量辐照后, 5'-dTMP样品中未损伤的碱基分子将随剂量的增大而减少。

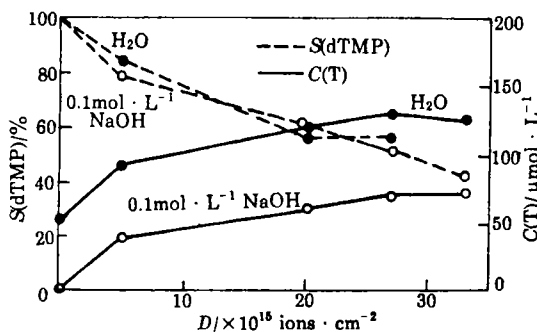


图4 离子束辐照后样品溶于不同溶剂中时5'-dTMP($m=0.64\text{mg}$, $C=0.4\text{mmol/L}$)的S(dTMP)及C(T)的剂量效应

Fig.4 The relative residual activity $S(dTMP)$ and the base concentration $C(T)$ in samples irradiated by ion beam. The irradiated sample were dissolved into water and 0.1mmol/L NaOH solution respectively

另外, 对比图3、图4可见, $C(P_i)_{\text{H}_2\text{O}} < C(T)_{\text{H}_2\text{O}}$, 即离子束辐照后5'-dTMP样品水溶液中的碱基浓度大于无机磷的浓度, 这说明在离子束对5'-dTMP的辐照损伤中, 与 γ 辐射一样, 碱基被优先释放, 然后才释放无机磷, 而受辐照的样品经碱处理后, 有 $C(P_i)_{\text{NaOH}} > C(P_i)_{\text{H}_2\text{O}}$, $C(T)_{\text{NaOH}} < C(T)_{\text{H}_2\text{O}}$, 这意味着碱处理不仅能损伤那些碱不稳定的磷酸酯, 使之释放无机磷, 而且还能损伤游离碱基。这里, 经碱处理后样品中碱基浓度减小到原来的一半左右, 最后使得辐照后5'-dTMP的NaOH中的碱基浓度小于无机磷浓度, 即 $C(T)_{\text{NaOH}} < C(P_i)_{\text{NaOH}}$ 。

3 讨 论

由于离子束辐照作用为直接作用, 辐照后样品溶于水中时不会产生OH自由基, 从而不会由此引起无机磷释放量的增加, 而辐照产生的不稳定磷酸酯在常温下分解很慢, 因此可认为在样品水溶液中即时测得的无机磷即为样品受辐照时所产生的无机磷。

离子束辐照后样品经 0.1mol/L NaOH处理后, 即刻测得的无机磷量就增至样品水溶液中的无机磷量的1.7倍, 40min后, 则达2.8倍。而Ward用 0.1mol/L NaOH处理受 γ 射线辐射的3'5'-dTMP样品10—40min后, 无机磷的释放量只增至水溶液中的1.5倍^[10]; Boop在用 1mol/L NH_4OH 处理受照后DNA 30min后, 得知链断裂数亦增至水溶液中的1.5倍左右^[8]。碱处理产生无机磷主要是由于不稳定磷酸酯快速分解的缘故, 由此可见, 离子束辐照能产生更多的不稳定磷酸酯。考虑到离子束辐照还具有高的 $G(P_i)$ 值, 可认为离子束辐照具有比 γ 射线辐射更强的损伤力。

电离辐射核苷酸所产生的碱不稳定性磷酸酯主要具有S-P结构(S为戊糖, P为磷酸根基团)^[10]。实验结果显示, 碱处理能使碱基裂解, 因而碱不稳定性磷酸酯还可具有 $B^* - S - P$ 结构(B^* 为具有受损位点的碱基)。碱处理使 B^* 受到攻击而裂解, 产生 $S^* - P$ 磷酸酯, 它再进一步释放出无机磷。

参 考 文 献

- 1 余增亮, 何建军, 邓建国, 等. 安徽农业科学, 1989; 1:12

- 2 Yu Zengliang, Shao Chunlin. Radiat Phys Chem, 1994; 43(4):349
- 3 Shao Chunlin, Yu Zengliang. Radiat Res, 1994:
- 4 鲁润龙, 朱学良, 余增亮, 等. 安徽农学院学报, 1991; 18(4):294
- 5 邓建国, 博士论文, 中国科学院等离子体物理研究所, 1992
- 6 Ward J F. Int J Phys Chem, 1971; 3:239
- 7 Daniels M, Scholes G, Weiss J. J Chem Soc, 1956:3771
- 8 Boop A, Hagen J. Biochem Biophys Acta, 1970; 209:320
- 9 王高栋, 王在兰, 张加山. 辐射研究与辐射工艺学报, 1985; 3(3):14
- 10 Ward J F, Kuo I. Int J Radiat Biol, 1973; 23(6):545

A study on irradiation damage of solid 5'-dTMP implanted by low energy N^+ ion beam

Shao Chunlin Yu Zengliang

(Institute of Plasma Physics, Academia Sinica, Hefei 230031)

Abstract

The yields of inorganic phosphate and base released from 5'-dTMP irradiated by 30 keV N^+ ion beam were investigated. The fluence effects of these yields and the influence with 0.1 mol/L NaOH treatment on them were presented. It was shown that the alkali treatment would not only increase the yield of inorganic phosphate, but also damage and then split base released from the irradiated 5'-dTMP. When the irradiated samples were treated with 0.1 mol/L NaOH immediately, the yield of inorganic phosphate was increased by a factor of 1.7 and the concentration of base decreased to half of that in the sample's water solution. Furthermore, the yield of inorganic phosphate would increase by a factor of 2.8 after 40 min of alkali treatment. Irradiation effects of ion beam were mainly direct ones and had a higher value of $G(P_i)$, greater than 0.44 molecule/100eV.

Key words Ion beam irradiation, 5'-dTMP, Inorganic phosphate release,
Base release, Alkali treatment