

低能离子注入对脱氧胸苷的辐照损伤*

邵春林 孙洪奎 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

摘要 用紫外分光光度法测量了脱氧胸苷(dTR)在20keV N^+ 离子束辐照下残余活性S和碱基T释放量的剂量效应。发现S与样品的质量有关,且受损dTR分子中约有50%可产生碱基T。而强碱、强酸的后处理使这一比例显著下降,平均分别只有23%和41%,与 γ 辐射时的情况相反。

关键词 离子束, 脱氧胸苷, 辐照损伤

低能离子辐照生物技术已被成功地应用于农作物改良、细胞刻蚀和转基因工程等方面^[1-3]。目前,对其机理的研究多集中在细胞和个体水平上^[4-6],对分子水平上的辐照损伤如DNA链的断裂、核苷酸和碱基损伤的研究也取得了一定的进展^[7,8]。但关于核苷这一DNA组分在离子束作用下损伤的研究还未见报道。一般电离辐射下,核苷的重要辐解反应之一是脱碱基,且当溶液的pH>12.5时,碱基的释放量显著增加^[9,10]。DNA中核苷的脱碱基将产生AP位点,它可进一步导致DNA链断裂和基因突变。我们用紫外分光光度法研究了脱氧胸苷在离子束辐照下的残余活性及其碱基释放量的剂量效应,以及酸、碱处理对它们的影响。

1 材料与 方法

1.1 材料。脱氧胸苷(dTR)、胸腺嘧啶(T)均为中国科学院上海生物化学研究所生产的层析纯产品,其OD₂₈₀/OD₂₆₀分别为0.54和0.71,使用前没有进一步纯化。其它试剂均为分析纯。

1.2 辐照源。辐照所用 N^+ 离子束由中国科学院等离子体研究所离子束生物工程装置产生,其能量选为20keV,束流为20mA。靶室真空度低于1.33mPa,采用脉冲式辐照,每次脉冲剂量由Faraday筒测得为 10^{15} ions/cm²。

1.3 方法。取0.5ml含1.00mg脱氧胸苷的水液铺于载玻片上,于45℃烘干,制成薄膜样品。经20keV N^+ 离子束辐照前后的dTR样品,以4ml蒸馏水将其从载玻片上洗下。取0.5ml洗液,分别加于5ml水或pH 0.5的H₂SO₄或1mol/L的NaOH中,测各溶液的紫外吸收,并以未辐照样品为对照,测各样品的残余紫外活性。将上述样品水溶液在95℃水浴中处理2h后,再作紫外测试。另以同样方法测质量为0.75mg的dTR样品在离子束辐照下的残余活性。为计算离子束辐照后dTR样品中T的产生量,测胸腺嘧啶T在上述三种溶剂中的紫外吸收,然后根据混合物紫外吸收的Beerio-Lamberti定理,求dTR的残余浓度和T的产生量。

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期:1995-08-23, 修回日期:1995-10-26

2 结果与分析

2.1 碱基产生量的剂量效应。实验测得dTR分子在水或pH 0.5的H₂SO₄或1mol/L的NaOH中的特征紫外吸收波长 $\lambda_{\max}$ 分别为267nm、267nm和268nm。不同剂量离子束辐照后的dTR样品之各溶液的 $\lambda_{\max}$ 没有明显变化,但它们的相对强度即残余活性S则随剂量的增大而减小,且S与样品的质量有关:质量小的样品,其残余活性小(如图1)。说明质量小的样品受离子束的损伤大。这是由于具有短射程特性的离子束能更好地与小质量、薄厚度样品发生相互作用的缘故。

另外,由图1可见,受离子束辐照后,质量为1.00mg的dTR样品的相对残余活性曲线在离子束剂量为5—45D₀时,有一隆起的肩型,而不是典型的指数型,说明该样品中产生了新的具有紫外吸收能力的物质——最有可能的是由dTR的糖苷键断裂而产生的碱基T。T在上述水或酸溶液中的 $\lambda_{\max}$ 为264.5nm,在1mol/L NaOH溶液中的 $\lambda_{\max}$ 为280nm。一般说来,dTR分子水、酸溶液的OD_{264.5}/OD₂₆₇值及其1mol/L NaOH溶液中的OD₂₈₀/OD₂₆₈值应为常数。但实际测得经不同剂量离子束辐照后的dTR样品,其水、酸、碱溶液的上述紫外吸收之比值却随剂量的增加而增加(如图2)。这进一步说明了离子束辐照后的dTR固态样品中含有其辐解产物碱基T,其量可由混合物紫外吸收定理求得。

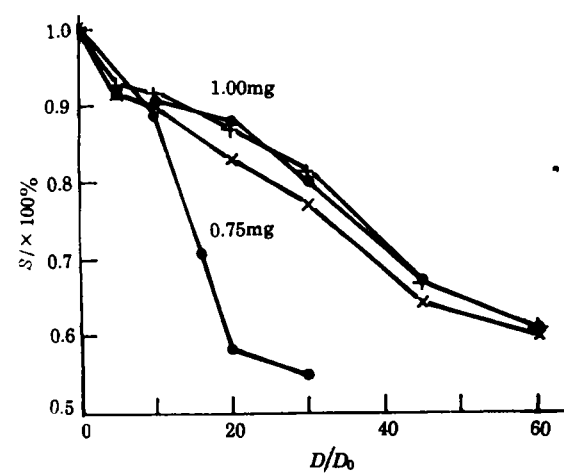


图1 20keV N⁺离子束辐照下不同质量dTR样品残余活性的剂量效应
● 水溶液, + 酸溶液, × 碱溶液
Fig.1 Dose effects of residual activities of dTR samples with different weight after the irradiation of 20keV N⁺ ion beam
● Water solution, + Acid solution, × Alkali solution

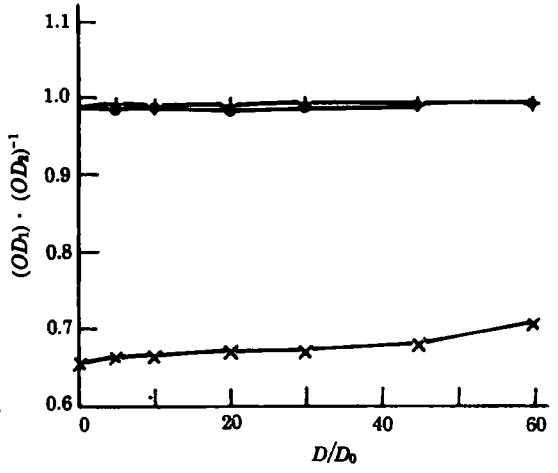


图2 离子束辐照后dTR样品之不同溶液在T、dTR的特征波长处的紫外吸收之比
● 水溶液的OD_{264.5}/OD₂₆₇, + 酸溶液的OD_{264.5}/OD₂₆₇, × 碱溶液的OD₂₈₀/OD₂₆₈
Fig.2 The ratios of UV absorptions at characteristic wavelengths of dTR and T in different solutions
● OD_{264.5}/OD₂₆₇ of water solution, + OD_{264.5}/OD₂₆₇ of acid solution, × OD₂₈₀/OD₂₆₈ of alkali solution

分别以dTR分子和T分子紫外吸收的 $\lambda_{\max}$ 作为 λ_1 、 λ_2 。水溶液中, $\lambda_1=267\text{nm}$, $\lambda_2=264.5\text{nm}$, 则 $E_{11}=9650$, $E_{22}=7890$, 另测得 $E_{21}=9518$, $E_{12}=7800$, 其中 E_{ij} ($i, j=1, 2$) 分别为dTR ($j=1$)和T ($j=2$)在波长 λ_1 ($i=1$)和 λ_2 ($i=2$)处的摩尔消光系数。根据Beerio-Lamberti定理, 由不同剂量离子束辐照后dTR样品的水溶液在 λ_1 、 λ_2 处的紫外吸

收值,可计算出其中dTR分子的残余浓度 C_{dTR} 和所产生的碱基T的浓度 C_T (如图3)。由图3可以看出,离子束辐照后的dTR样品中dTR分子的残余浓度随剂量增大呈线性下降,而不是图2所示的带有隆起的曲线;而碱基T的释放量则随剂量的增大而增加,并逐渐趋于饱和。

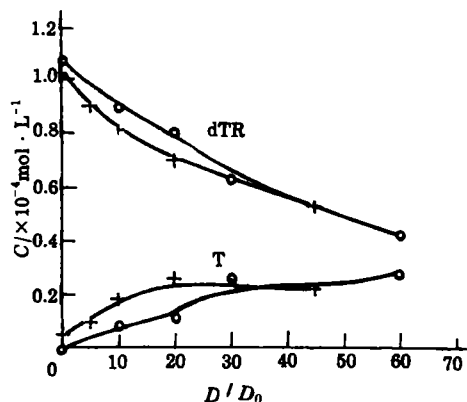


图3 离子束辐照后dTR样品的水溶液中 C_{dTR} 和 C_T 的剂量效应及热处理对它们的影响
+ 热处理

Fig.3 The dose effects of C_{dTR} and C_T in water solution of the irradiated dTR sample and the influence of heat treatment on them
+ Heat treatment

度变化,dTR残余浓度略有下降,而T的浓度则有所升高。说明热处理可使dTR,尤其是具有辐射损伤位点的、不稳定的dTR*分子裂解而释放碱基T。

2.2 碱、酸处理对T释放量的影响。对离子束辐照后dTR样品的1mol/L的NaOH溶液和pH 0.5的 H_2SO_4 溶液,同样可根据Berrio-Lamberti定理求得其中dTR分子的残余浓度和碱基T的产生量。对dTR样品的碱溶液,取 $\lambda_1=268\text{nm}$, $\lambda_2=280\text{nm}$ 。测得dTR分子的 $E_{11}=7380$, $E_{21}=4850$, T分子的 $E_{12}=4940$, $E_{22}=5710$ 。dTR样品酸溶液的 λ_i 、 E_{ij} ($i,j=1,2$)与其水溶液的相同。根据辐照后dTR样品的碱、酸溶液在各自 λ_1 、 λ_2 波长处的紫外吸收值,可计算出各溶液中dTR分子的残余浓度 C_{dTR} 和碱基T的浓度 C_T (如图4)。

值得注意的是,1mol/L NaOH碱处理后的样品溶液中T的浓度不是增大,反而小于它在水溶液中的 C_T 值。由图4中数据计算可知,在碱溶液中,平均约有23%的dTR损伤分子可转化为碱基T,小于水溶液中的平均值(50%)。同样从计算可知,在离子束辐照后dTR样品的酸溶液中,平均约有41%的受损dTR分子可转化为碱基T,介于水溶液和碱溶液中的转化率之间。这种强碱、强酸处理使离子束辐照后dTR样品中碱基的释放量减少的现象,与 γ 射线辐射下的核苷经碱处理后碱基的释放

dTR的辐射损伤中,相当部分是辐解产生的碱基T。由图3中的数据计算可知,在剂量为 $30D_0$ 前,dTR损伤中能产生碱基T的分子数比例从50%逐渐达60%左右,但当剂量进一步增大至 $45D_0$ 时,该份额将下降至42%左右,这说明碱基的产生量有一个从小到大再变小的过程。原因是离子束射程内的dTR是有限的,它所能产生的碱基量也是有限的,并且T在产生的同时,亦受到进一步到来的离子束的损伤。当T的损伤率小于其产生率时,T的产生量随剂量而增加,但当T的损伤率等于、大于其产生率时,T的量将在达到平衡后进一步减少。

图3还给出了离子束辐照后dTR样品的水溶液经 95°C 水浴热处理2h后的dTR和T的浓度

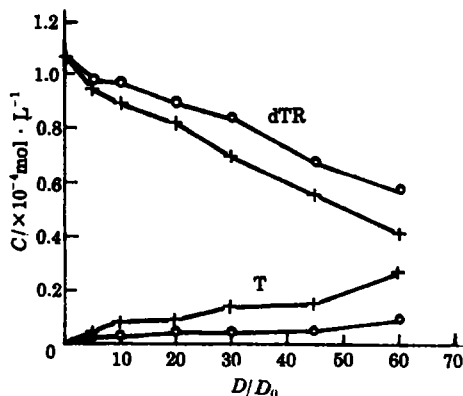


图4 离子束辐照后dTR样品的碱、酸溶液中 C_{dTR} 和 C_T 的剂量效应
○ 碱溶液, + 酸溶液

Fig.4 Dose effects of C_{dTR} and C_T in alkaline and acid solution of the irradiated dTR samples

○ Alkali solution, + Acid solution

量显著增加这一结果相反。这可能是由于碱、酸处理导致核苷中受损碱基裂解的缘故。

3 讨 论

由实验结果可见,离子束辐照后的dTR分子所释放碱基的量不因碱、酸的后处理而增加,这显然不同于 γ 射线辐射时的情况,说明它们有不同的机制。 γ 射线辐照时,核苷的释碱基主要是OH自由基间接作用的缘故。在强碱处理下,因OH加合机制或 O^- 机制,碱基释放量将显著增加;而在强酸作用下,则因氧化机制而使碱基的释放量增加^[9,10]。但离子束辐照下,核苷的释碱基主要是由注入离子的直接作用使其糖苷键断裂而引起的。同时,辐照的直接作用还可产生 B^*-S 结构(B^* 为含损伤位点的碱基, S 为戊糖),其结构不稳定。在强酸、强碱作用下, B^*-S 可因电子重排、共轭结构的变化而引起其中碱基结构的开环、裂解,导致碱基释放量的减少。

另外,离子束辐照后的核苷释碱基的量在经碱处理后约减少至原来的46%,与5'-dTMP在离子束辐照下碱基释放量因0.1mol/L NaOH的后处理而减小为原来的一半左右这一结果很相似^[8],说明核苷酸中磷酸根基团对碱基的释放影响不大。

参 考 文 献

- 1 Yu Zengliang, Wu Yuejin, Deng Jianguo, *et al.* Nucl Instr Meth B: Phys Res, 1991; B59/60:705
- 2 余增亮, 邵春林, 扬剑波. 安徽农业大学学报, 1994; 21:206
- 3 扬剑波, 吴李君, 吴家道, 等. 科学通报, 1994; 39:153
- 4 余增亮, 霍裕平. 安徽农业大学学报, 1994; 21:221
- 5 周立人, 黄玲, 程备究, 等. 安徽农业大学学报, 1994; 21:269
- 6 江泽慧, 彭镇华. 安徽农业大学学报, 1994; 21:295
- 7 鲁润龙, 朱学良. 安徽农学院学报, 1991; 18:294
- 8 邵春林, 余增亮. 核技术, 1994; 18:15
- 9 Fujitz S. Int J Radiat Biol, 1984; 45:371
- 10 Scholes M L, Schuchmann M N, Von Sonntag C. Int J Radiat Biol, 1992; 61:443

Irradiation—induced damage of thymidine by low energy ion implantation

Shao Chunlin Sun Hongkui Yu Zengliang

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

Abstract

With UV spectrophotometry, the dose effects of residual activity S of thymidine irradiated by 20keV N^+ ion beam and of based T released from the irradiated thymidine were studied. It was found that S was related to the irradiated sample's weight, and that about 50% of the damaged dTR molecules was able to produce based T . The post-treatment of strong alkali or strong acid made this proportion be reduced to 23% and 41% respectively, which showed a tendency contrary to that under gamma-ray irradiation.

Key words Ion beam, Thymidine, Irradiation damage