

文章编号: 0258-7025(2009)10-2642-05

激光拉曼光谱分析俄歇电子对基因结构的影响

程木华^{1,2} 黄耀熊² 吴正洁² 黄宝天² 刘 志¹

(¹ 中山大学附属第三医院核医学科, 广东 广州 510630; ² 暨南大学生物医学工程系, 广东 广州 510630)

摘要 分析俄歇电子辐射对基因结构及成分的影响, 探讨其基因损伤的机制。应用激光拉曼散射测定, 以放射性碘-125(¹²⁵I)标记甲胎蛋白(AFP)基因引物与 AFP 基因杂交结合辐射后, 不同时间内其俄歇电子对基因结构的变化以及对碱基成分的损害程度。结果显示, DNA 的骨架构像及碱基的特征振动光谱发生偏移, 谱线强度在 2~24 h 改变较大, 而 24 h 与 72 h 变化较小。拉曼光谱显示俄歇电子近距离辐照可以引起 DNA 的磷酸二酯骨架结构损伤, 基因中碱基暴露, 基团损伤, 甚至破坏, 基因构像由 B 型转变为 C 型特征光谱。结果表明, 俄歇电子辐照可改变靶基因骨架结构和构像, 损伤或破坏碱基, 从而影响靶基因的生物功能。

关键词 激光; 拉曼光谱; 俄歇电子; 辐射; 基因

中图分类号 O657.37; R817.8 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2642

Evaluation of the Auger Electron Radiation on Gene with Raman Spectroscopy

Cheng Muhua^{1,2} Huang Yaoxiong² Wu Zhengjie² Huang Baotian² Liu Zhi¹

¹ Nuclear Medicine Department of Third Hospital Affiliated Sun Yat-sen University,
Guangzhou, Guangdong 510630, China

² Biomedical Engineering Department, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510630, China

Abstract We explored the mechanism of gene damaged by Auger electron using the Raman spectroscopy. The primers of the gene of alpha fetoprotein were labeled with radioactive iodine-125, and combined the gene of alpha fetoprotein. After the Auger electron emitted from iodine-125 radiated on gene two hours, the Raman spectroscopy was applied to investigate the influence of Auger electron to the biogenic conformation and functional groups in aqueous solution, with 514.5 nm excitation. The results show that the peak of the characteristic Raman spectra moves and the peak intensity changes with the Auger electron radiation from 2 hours to 24 hours. The change of Raman spectra indicates that the construction of the phosphodiester linkage harmed, the pyridine and purine bases in DNA emerged and damaged, the model of gene conformation changed from B form to C form spectrum. In conclusion, the Auger electron closely radiation may change the construction of backbone of DNA, destroy local pyridine and purine bases in DNA, and change the conformation of gene.

Key words laser; Raman spectroscopy; Auger electron; radiation; gene

1 引 言

靶向核素基因治疗中常用的核素是放射性碘-125(¹²⁵I), ¹²⁵I 发射称之为分子刀的俄歇电子作用于靶基因, 不但可以产生一定生物效应^[1~3], 更具有辐射距离短、作用精确且对周边组织辐射危险性低的

优点。但俄歇电子对基因损伤机制仍不完全清楚, 特别是缺乏俄歇电子对基因损伤的直接证据。鉴于激光拉曼光谱技术在生物分子结构检测研究中, 具有信息最大、速度快和检测方便等优点^[4~6], 通过对 DNA 拉曼光谱的分析, 可以得到有关主链结构、局

收稿日期: 2008-12-02; 收到修改稿日期: 2009-05-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B31201006)和广东省自然科学基金(07001564)资助课题。

作者简介: 程木华(1965—), 男, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事分子核医学及核素治疗等方面的研究。

E-mail: chmarka@163.com

导师简介: 黄耀熊(1951—), 男, 博士, 教授, 主要从事激光医学及医学物理等方面的研究。E-mail: tyxhuang@jnu.edu.cn

部构像、氢键和各碱基堆积情况的特定信息^[4,5]。为此,本文利用激光拉曼光谱检测技术,测定分析俄歇电子直接辐射的靶基因结构及碱基受到的影响,以提供俄歇电子对基因损伤的直接证据,并探讨俄歇电子靶向治疗基因疾病的分子机理。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

放射性碘-125(原子高科股份有限公司),5-碘-脱氧尿嘧啶(IdU)(中国 Sigma 股份有限公司),甲胎蛋白(AFP)引物和 AFP 基因(深圳欣海凌生物科技有限公司),端粒转移酶(北京纽英伦生物技术有限公司),拉曼激光显微镜(法国 Horiba JY 公司,型号 LabRam INV)。

2.2 研究方法

2.2.1 AFP 引物的碘-125 标记方法

参照 Schaffland 等^[3]报道方法进行碘-125 标记 IdU,简要步骤:先用三丁锡置换脱氧尿嘧啶的 5 位甲基,再用 Iodogen 方法,使碘-125 置换到甲基上,SEP-Pac RP-18 柱纯化得碘-125 标记的脱氧尿嘧啶(¹²⁵I-IdU)。然后,应用末端转移酶使¹²⁵I-IdU 与 AFP 引物 5'端,经小片段 DNA 纯化柱纯化,获得碘-125 标记 AFP 基因引物(¹²⁵I-AFP primer),HPLC 分析显示标记率为 96%以上。

2.2.2 携带碘-125 的引物与 AFP 基因结合

把 200 μ L 3.7 mmol/L AFP 基因溶液分成 10 分,分别加入 10 个离心(EP)管中,每 2 管为 1 组,其中第 1 组为对照组(不加核素辐照),第 2~4 组分别加入放射性浓度为 296 kBq/ μ L 的¹²⁵I-U-AFP 引物,混合后在聚合酶链反应(PCR)仪器里模拟 PCR 反应:95 $^{\circ}$ C,4 min,(95 $^{\circ}$ C,20 s,60 $^{\circ}$ C,30 s) \times 3 次,4 $^{\circ}$ C,10 min,使引物与 AFP 模板结合。第 2~4 组

依次在结合作用 2 h,12 h,24 h,72 h 后分别进行激光共焦拉曼散射扫描测定,对照组在每个时间段均同时进行拉曼扫描测定。

2.3 激光拉曼检测方法

应用 LabRam INV 倒置拉曼激光显微镜,配置的激光器为 Ar⁺ 离子激光器,其激发波长为 514.5 nm。该系统使用奥林巴斯倒置显微镜,实验使用 60 倍物镜。激光焦点处光斑直径约为 2 μ m,功率为 25 mW,狭缝设置为 100 μ m,共焦孔径设置为 200 μ m,实验采集的波谱范围为 400~1800 cm^{-1} ,谱分辨率约为 1 cm^{-1} ,曝光积分时间为 15 s。

依次取上述 10 管内纳米粒溶液分别滴加在专用载玻片上,调整焦距,按上述条件对样品进行拉曼检测,重复 3 次。检测前利用硅片位于 520.7 cm^{-1} 的谱带进行日常系统校正,对于接收的拉曼谱线中出现的宇宙射线利用该系统提供的功能进行宇宙射线的去除。与正常指纹图谱比较,分析各样品对 DNA 结构、局部三维构像、氢键和各碱基的变化。谱线相对强度计算公式为 $\Delta I_n = I_n - I_0$,即各谱线位点强度相对于该谱线基线的强度,其中, I_0 代表 DNA 谱线基线强度值, I_n 代表 DNA 谱线上显示强度值。谱线强度相对变化率改变说明它所属的基团或化学键受到了损伤,谱线的位移则意味着相应的基因或化学键发生了变化^[4~8]。

3 结果与讨论

在发射俄歇电子的核素碘-125 近距离辐照甲胎蛋白基因 DNA 2 h,12 h,24 h,72 h 后以及未辐照对照 DNA 的拉曼光谱如图 1 所示。它们的拉曼特征频率和指认^[7,8]如表 1 所示。

表 1 俄歇电子辐照 AFP DNA 2 h,12 h,24 h 及 72 h 后的光谱频率及归属

Table 1 Raman frequencies and assignments of AFP DNA and after Auger electron radiation

In aqueous solution/ cm^{-1}	2 h Auger radiation / cm^{-1}	12 h Auger radiation / cm^{-1}	24 h Auger radiation / cm^{-1}	72 h Auger radiation / cm^{-1}	Tentative assignments
444 w	448	444	445	446	Cytosine, & CH ₂
471 m	472	473	476	476	Thymine
659 s	660	660	657	657	Guanine
701 m	700	701	700	708	Adenine
784 m	781	786	788	787	Thymine, PO ₂
831 w	831	832	833	833	PO ₂ , B type
881 w	881	880	881	881	C type (d-p, bk)
926 w	927	928	930	929	Deoxyribose
1047 w	1049	1045	1045	1047	Guanine

(续表)

In aqueous solution/cm ⁻¹	2 h Auger radiation /cm ⁻¹	12 h Auger radiation /cm ⁻¹	24 h Auger radiation /cm ⁻¹	72 h Auger radiation /cm ⁻¹	Tentative assignments
1072 w	1075	1077	1080	1081	Glycine
1089 m	1092	1093	1095	1095	PO ₂ , bk
1191 w	1194	1191	1188	1188	C=N, Guanine
1227 m	1229	1227	1215	1217	Adenine
1308 w	1314	1308	1310	1299	Adenine
1455 w	1453	1455	1459	1458	Deoxyribose & CH ₂
1528 m	1526	1524	1533	1533	Cytosine, Guanine
1612 m	1611	1612	1613	1610	Adenine
1637 m	1637	1638	1630	1628	Guanine
1659 m	1672	1669	1667	1669	C=O, bk
1743 w	1744	1750	1743	1743	C-C twist

Abbreviations; s; strong, m; medium, w; weak, bk: indicates a vibration of the DNA backbone, d-p: indicates a vibration of the deoxyribose-phosphate moiety.

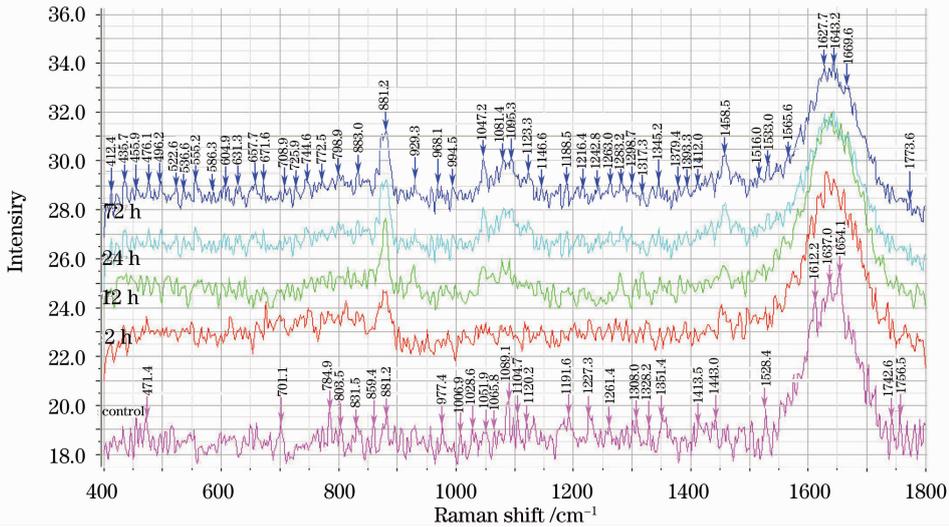


图 1 俄歇电子体外辐照 AFP DNA 2 h, 12 h, 24 h 及 72 h 后的拉曼光谱图

Fig. 1 Raman spectrum images of AFP DNA after Auger electron radiation in 2 h, 12 h, 24 h and 72 h

谱线 830 cm⁻¹ 是 B 型 DNA 核酸骨架的特征谱线^[7,9], 从图 1 可见, 俄歇电子辐照后谱线轻微偏移, 强度轻度降低。然而, 属于磷酸根离子(PO₂⁻) 对称伸缩振动在 1089 cm⁻¹ 的谱线位移到 1095 cm⁻¹, 标志 B 型 DNA 骨架和胞嘧啶的磷酸二酯(PO₂)^[7,8] 的对应伸缩振动的 784 cm⁻¹ 谱线位移到 787 cm⁻¹, 强度随辐照时间延长减弱 40% 以上; 标志核苷 C-C 构像^[10] 的振动谱 1743 cm⁻¹ 也发生偏移及强度降低。这些变化说明了 B 型 DNA 的骨架结构受到一定程度损伤。然而标志 C 型 DNA 骨架脱氧核糖上的磷酸根(PO₂) 的振动谱^[7,10] 881 cm⁻¹, 辐照 2 h 后就有明显增强, 并随时间延长而进一步增强。这些谱线的变化说明俄歇电子辐照可引起 DNA 的骨架结构损伤及构像变化^[9~11]。尤

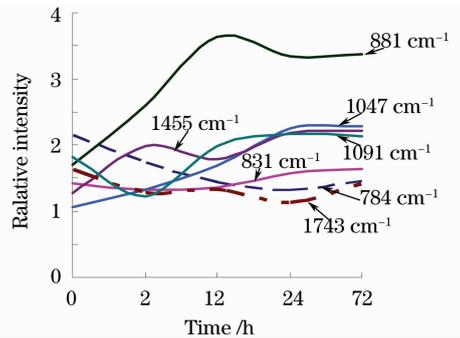


图 2 俄歇电子辐照不同时间的 DNA 结构的拉曼谱线强度变化

Fig. 2 Raman intensity of DNA spectrum after Auger electron radiation

其是 881 cm⁻¹, 1047 cm⁻¹, 1455 cm⁻¹ 谱线的变化, 说明 DNA 中脱氧核糖体暴露, 超螺旋结果部分解

旋;它们的峰值明显增强,且出现部分碱基堆积,说明 DNA 主链局部被打断^[7,10]。以上谱线强度随时间变化的规律见图 2,显示谱线相对强度在辐照 2~24 h 内改变较大,而在 24 h 与 72 h 之间的谱线相对强度变化不多。这可能是由于俄歇电子近距离辐射 DNA,在 24 h 内已经对靶基因产生足够损伤并与 DNA 脱离,俄歇电子不能再近距离发挥有效作用。

属于脱氧核糖的谱线及其甲基基团伸缩振动谱的谱线^[5]为 1455 cm^{-1} ,其谱峰在辐照 24 h 后发生 $3\sim 4\text{ cm}^{-1}$ 偏移,且谱峰强度明显增强,而属于脱氧核糖环的 926 cm^{-1} 谱峰在辐射 12 h 内谱峰增强,但辐射 24 h 后谱峰又消失,说明辐照后 DNA 构像发生了改变,其脱氧核糖环暴露并损伤。俄歇电子辐射对不同的碱基也有不同程度的损伤,属于腺嘌呤环的谱线^[8,9] 701 cm^{-1} , 1227 cm^{-1} , 1308 cm^{-1} , 1612 cm^{-1} 均发生偏移,且辐照后谱线强度均明显减弱,甚至消失。属于鸟嘌呤环的谱线^[8,10] 659 cm^{-1} , 1047 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} 均发生偏移,辐照后 659 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} 谱线强度均明显减弱,甚至消失,这说明辐射对鸟嘌呤基团造成损伤,而 1047 cm^{-1} 谱线强度则明显增强,这说明鸟嘌呤碱基发生脱落而堆积。属于鸟嘌呤和胞嘧啶的 1528 cm^{-1} 谱线在辐照 2 h 后几乎消失;属于胞嘧啶环^[8] 的 1637 cm^{-1} 和 444 cm^{-1} 辐照后谱线均发生偏移和谱峰降低。俄歇电子对胸腺嘧啶环的损伤也相当严重,例如属于胸腺嘧啶环的 784 cm^{-1} 谱线^[7] 在辐照 2 h 后就几乎消失。这些变化说明俄歇电子辐照 DNA 可引起严重的碱基损伤,以及碱基的功能基团破坏。

核素基因治疗中常用的治疗核素是发射俄歇电子的核素,如 ^{125}I , ^{123}I 和 ^{77}Br 等^[1]。多数俄歇电子的能量为 $20\sim 500\text{ eV}$,在生物组织内的射程为 $1\sim 10\text{ nm}$,线性能量转换(LET)为 $10\sim 25\text{ keV}/\mu\text{m}$,属高 LET,与 α 粒子的 LET 接近^[3]。体外和体内、动物和人体实验已经证实,发射俄歇电子核素标记载体参入 S 期细胞的 DNA,核素衰变发出的俄歇电子靠其高 LET 可打断 DNA 链,破坏细胞的遗传物质。由于俄歇电子的射程极短($<10\text{ nm}$),仅相当于 6 个碱基对的距离,所以只有把这种核素带到靶基因附近,核素衰变才能作用于靶基因特定的位置,对靶基因发挥最佳辐射效应^[2,3]。但是,俄歇电子作用于 DNA 靶点后,是否仅仅对 DNA 主链产生局部作用,或是对 DNA 其他

部分具有损伤作用,还需要有直接的实验证据。我们的实验结果提示,俄歇电子近距离作用于 DNA,可引起核糖环损伤,基团暴露,对核糖上的磷酸二酯键及 DNA 骨架结构均有一定损伤。这是由于碘 125 是轨道电子俘获衰变核素,电子俘获后 93% 的能量发生内转换给俄歇电子,仅 7% 以低能 γ 射线的方式释放,并且低能 γ 射线属于低 LET^[1,12],所以,其低能 γ 射线对基因结构的影响相对较小。此外,拉曼分析发现俄歇电子对 DNA 中嘌呤碱及嘧啶碱基及其功能基团均也产生明显损伤作用,其中一些嘌呤碱及基因骨架结构的谱线峰值强度增加,说明 DNA 主链局部断裂,出现碱基的脱落与堆积。所以,俄歇电子近距离辐照 DNA,不仅仅是简单地破坏基因链,而是通过改变基因构像,损伤基因中碱基及功能基团,破坏 DNA 结构及主链,从而影响基因生物功能。

4 结 论

俄歇电子对 DNA 的辐射作用,辐照 2 h 后就可出现靶基因结构及构像变化,同时对碱基上的功能基团也会产生严重损伤。辐照 12 h 左右就可引起 DNA 结构破坏,DNA 链局部断裂及碱基脱离堆积。所以,俄歇电子对靶基因 DNA 的作用可能主要是通过破坏局部基因结构与功能基团,影响靶基因的生物功能,达到基因治疗作用。激光拉曼光谱技术可通过对 DNA 的拉曼光谱分析,得到有关 DNA 主链结构、局部构像、功能键变化和碱基堆积情况的特定信息,为俄歇电子辐射引起的靶基因 DNA 损伤提供直接而充分的证据。

参 考 文 献

- 1 K. Datta, R. D. Neumann, T. A. Winters *et al.*. Characterization of a complex 125I-induced DNA double-strand break; implications for repair[J]. *Int J. Radiat. Biol.*, 2005, **81**(1): 13~21
- 2 I. V. Panyutin, O. A. Sedelnikova, W. M. Bonner *et al.*. DNA damage produced by 125I-triplex-forming oligonucleotides as a measure of their successful delivery into cell nuclei[J]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, **1058**: 140~50
- 3 A. O. Schaffland, A. B. Delaloye, M. Kosinski *et al.*. The preparation of clinical grade 5-[123I]iodo-2'-deoxyuridine and 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine with high in vitro stability and the potential for early proliferation scintigraphy[J]. *Nucl. Med. Commun.*, 2004, **25**(5): 461~8
- 4 Tang Yulong, Guo Zhouyi. The application and development of Raman spectroscopy on biological molecule DNA[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2004, **13**(5): 387~397
- 5 唐玉龙, 郭周义. 激光拉曼光谱技术在生物分子 DNA 研究中的应用和进展[J]. *激光生物学报*, 2004, **13**(5): 387~393
- 5 N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan *et al.*. Nonresonant

- confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells[J]. *Biophys J.*, 2003, **84**(6): 3968~3981
- 6 Shen Gaoshan, Gu Huaimin, Yan Tianxiu *et al.*. Micro-Raman spectroscopy of the interaction between sodium nitrite and oxyhemoglobin [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1432~1436
沈高山, 谷怀民, 闫天秀 等. 亚硝酸钠和氧合血红蛋白反应的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2008, **35**(9): 1432~1436
- 7 Tang Yulong, Guo Zhouyi. Comparison of influences of different intervals of ultraviolet irradiation on calf thymus studied by Raman spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(4): 653~657
唐玉龙, 郭周义. 不同波段的紫外光对小牛胸腺 DNA 损伤的拉曼光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, **26**(4): 653~657
- 8 J. D. Gelder, K. D. Gussem, P. Vandabeele *et al.*. Reference database of Raman spectra of biological molecules[J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2007, **38**: 1133~1147
- 9 D. Pappas, B. W. Smith, J. D. Winefordner. Raman spectroscopy in bioanalysis[J]. *Talanta*, 2000, **51**(1): 131~144
- 10 O. Vrána, V. Masek, V. Drazan *et al.*. Raman spectroscopy of DNA modified by intrastrand cross-links of antitumor cisplatin [J]. *J. Struct. Biol.*, 2007, **159**(1): 1~8
- 11 Heng Hang, Ke Weizhong, Ji Kang. Spectral analysis of DNA solution treated with acid at various pH for different time [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(5): 932~935
衡 航, 柯惟中, 籍 康. 经不同 pH 值不同时间酸处理的 DNA 溶液拉曼光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(5): 932~935
- 12 Kuang Anren, Wang Xingxiao. The applied research of target therapy of the radioactive nuclide emitted with Auger electron [J]. *Chinese Journal of Nuclear Medicine*, 1999, **19**(3): 191~192
匡安仁, 王行肃. 发射俄歇电子核素靶向治疗应用研究[J]. *中华核医学杂志*, 1999, **19**(3): 191~192