

竹红菌甲素敏化质粒 pBR 322 DNA 光氧化 ——使封闭环 DNA 转变为开环 DNA

贾弘禔 付毅平* 董苍玉

(北京医科大学生物化学教研室, 北京)

摘要 甲素可敏化质粒 pBR 322 DNA 光氧化断链的使其封闭环 DNA 转变为开环 DNA。甲素敏化 pBR 322 DNA 光氧化反应可被单线态氧淬灭剂— NaN_3 抑制, 证明此光敏氧化机制属 II 型过程。

关键词: 竹红菌甲素 DNA 光敏氧化作用 单线态氧

核酸的光敏氧化作用 (Photosensitized Oxidation) 是近十年生物化学家和生物物理学家在光生物学 (Photobiology) 领域开创的新课题。六、七十年代工作表明, 有核黄素等光敏剂存在时, 核酸经光照射发生粘度、沉降常数、融解温度等物理性质改变^[1,2]。近几年研究证明, 核黄素或血卟啉衍生物等可引起多核苷酸链中某些碱基, 如鸟嘌呤氧化, 使核酸单、双链断裂^[3-5]。DNA 光损伤后, 其模板功能即发生障碍^[5]。在光敏氧化反应中, 光敏剂诱使 DNA 光损伤的机制涉及 I 型 (自由基) 过程^[3]。近年来, II 型 (单线态氧) 过程在 DNA 光损伤中的作用受到愈来愈多的重视^[4,5]。无疑, 有关核酸光敏氧化的研究对探讨 DNA 的损伤和修复, 基因突变和光疗机理具有理论和实际意义。

竹红菌甲素 (简称甲素) 是近年在我国发现的一种新型光敏剂和光疗药物。本室以工作表明, 甲素结合光照可抑制小鼠实体瘤生长; 体外研究证明, 甲素可抑制 ^3H -TdR 参入肿瘤细胞 DNA 的速率^[6]。近期工作发现甲素可引起鸟嘌呤和胸腺嘧啶光氧化分解^[7]; 并使小牛胸腺 DNA 融解温度和园二色谱发生变化^[8]。为进一步观察甲素对 DNA 的损伤作用, 探讨核酸光敏反应机制, 本工作采用琼脂糖胶电泳技术检测了质粒 pBR 322 DNA 在甲素敏化的光氧化反应中发生的分子结构变化。结果表明, 甲素可引起封闭环 DNA (ccDNA) 氧化断链, 使成开环 DNA (ocDNA), 并证明 II 型过程在甲素敏化 DNA 光氧化反应中起作用。

材 料 和 方 法

一、试剂

1. 甲素, 来源及溶液配制同文献[6]。

* 基础医学专业82级学生

本文于1988年3月15日收到初稿, 1988年4月25日收到修改稿

2. 质粒 PBR 322 DNA, 华美公司产品。

3. 琼脂糖, 浙江黄岩化工厂产品。

二、光源 ZG-220-55 竹红菌光敏治疗灯 (涂铊钨灯, 强谱线 $\lambda = 481\text{nm}$), 昆明灯泡厂出品。

三、pBR 322 DNA 的光敏化及其测定 在塑料板小室内加入10微升磷酸钾缓冲液 (10 mmol/L, PH7.8)、内含约 2 微克 PBR 322 DNA, 光敏剂、甲素、抑制剂 NaN_3 用量见结果。将塑料板置于冰水浴, 按文献[6]方法光照 (照度 $11.76 \times 10^4 \text{Lux}$) 光照后暗反应半小时, 按文献 3 进行琼脂糖胶电泳、胶浓度0.7%、1.5V/cm、电泳10小时。溴乙脞 ($0.5\mu\text{g/ml}$) 染色后在紫外灯下摄影。

结 果 和 讨 论

为观察有甲素存在时 PBR 322 DNA 发生的光氧化反应, 我们采用琼脂糖胶电泳分离样品 DNA 中的封闭环 DNA(ccDNA)、开环 DNA(ocDNA)和线性 DNA(LDNA), 根据 DNA 的区带变化判断 DNA 光氧化后发生的断链。结果发现, 未加甲素的 PBR 322 DNA 样品, 不论光照与否, 其电泳区带仅显示微量二聚体 DNA 和少量 ocDNA、LDNA 存在, 而以 ccDNA 为主(Fig.1, 2,)。此结果与厂家关于 PBR 322 DNA 几种构型的出品说明一致。加入 $6.23 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 的甲素、光照40分钟 (照度 $11.76 \times 10^4 \text{Lux}$), 未见明显区带变化。当甲素浓度增至 $12.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 时, 光照的 PBR 322 DNA 样品 ccDNA 区带消失, ocDNA 区带明显增加 (Fig.1)。结果提示, PBR 322 DNA 在 $12.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 的甲素存在时, 经光照射发生了氧化断链。

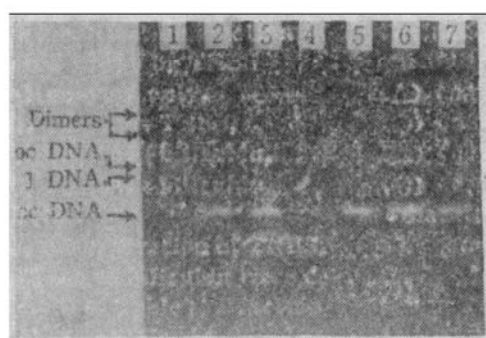


Fig.1 Agarose gel electrophoresis of pBR 322 DNA in HA-sensitized photooxidation. (Ha, Hypocrellin A)

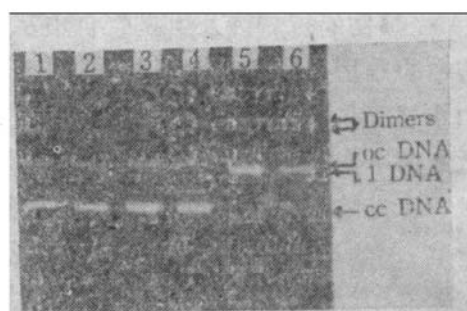


Fig.2 The effects of Irradiation time on HA-sensitized photooxidation of pBR 322 DNA.

	1	2	3	4	5	6	7
HA ($\times 10^{-6} \text{mol/L}$)	12.5	6.25	0		12.5	6.25	0
irradiation for 40 min	+	+	+		-	-	-

	1	2	3	4	5	6
HA ($12.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$)	-	+	-	-	+	+
irradiation time (min)	0	0	40	20	40	20

甲素敏化 pBR 322 DNA 氧化断链与光照时间有关。Fig.2 显示, 光照 20 分钟 (照度 $11.76 \times 10^4 \text{Lux}$) 即可使 DNA 样品中的 ocDNA 含量明显增加; 光照 40 分钟, ccDNA 完全氧化断链成 ocDNA。

在含甲素的 DNA 光反应体系中加入单线态氧(1O_2)淬灭剂—— NaN_3 , 其浓度在 2×10^{-4} mol/L 即可阻止 ocDNA 区带的出现, 表明未发生 pBR 322 DNA 的氧化断链, 提示 1O_2 与 DNA 的光敏氧化有关 (Fig. 3)。

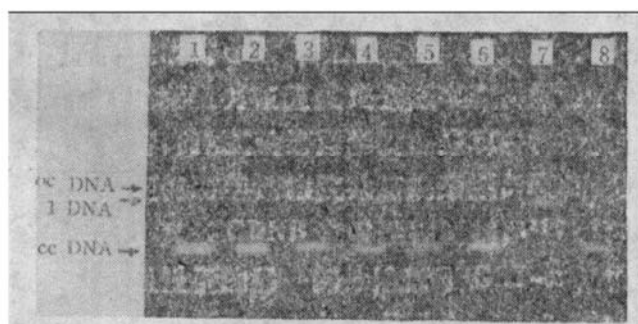


Fig. 3 The inhibitory effects of NaN_3 on HA-sensitized photooxidation of pBR 322 DNA. (HA, Hypocrellin A).

	1	2	3	4	5	6	7	8
HA (12.5×10^{-6} mol/L) +	+	+	+	+	+	+	+	+
irradiation for 40 min. +	-	+	-	+	-	+	-	+
NaN_3 ($\times 10^{-4}$ mol/L)	200	200	20	20	2	2	0	0

的抑制作用, 证明 1O_2 在甲素敏化 pBR 322 DNA 光氧化反应中起重要作用。我们未做三线态光敏剂和各种活泼氧等的抑制试验, 为此我们不排除 I 型机制的可能性。

有人认为, 光敏剂是否与核酸结合可能是确认 I、II 型过程的重要因素^[9]。I 型过程可发生光敏剂与 DNA 的结合, 而由卟啉衍生物诱发 DNA 光氧化的 II 型过程未发现光敏剂与 DNA 的结合^[4]。尽管甲素在光氧化体系中可与 DNA 结合^[8], 可是本工作观察到明显 NaN_3 效应, 使我们确信甲素敏化 ccDNA 氧化断链成 ocDNA 主要按 II 型过程进行。我们认为, 除考虑光敏剂与 DNA 结合与否, 光敏剂的性质是决定反应过程的重要因素。事实上, 光敏氧化过程是基态分子氧与反应物 (R)、基态光敏剂 (D) 竞相争夺三线态光敏剂 (3D) 能量的过程^[9]。在一个反应中, 究竟哪种过程占优势, 还取决于光敏剂、氧和反应物的浓度、类型及缓冲液的性质等。

核酸的光敏氧化研究证明, 多核苷链中鸟嘌呤发生分解, 产生不稳定的糖苷键, 致使核酸断链^[5]。虽然甲素可以引起鸟嘌呤和胸腺嘧啶光氧化分解^[7], 但甲素敏化 pBR 322 DNA 氧化断链是否与鸟嘌呤、胸腺嘧啶分解有关, 我们还缺乏直接的实验证据。甲素可引起 pBR 322 DNA 氧化断链, 也可产生 DNA-DNA 交联; 使二聚体 DNA 增多 (Fig. 1, Fig. 2)。在甲素敏化 pBR 322 DNA 光氧化反应中, DNA 链断裂位点何在? DNA-DNA 交联涉及何种碱基等, 我们尚无所知, 均有待进一步实验论证。

参 考 文 献

- [1] Bellin J.S. and Yankns C.A., *Biochem. Biophys. Acta*, (1966), 112, 363-371.
- [2] Speck w.T., et al., *ibid.*, (1976), 435, 39-44.
- [3] Korycka-Dahl M. and Richardson T., *ibid.*, (1980), 610, 229-234.

- [4] Fiel R.J., et al., *Cancer Res.*, (1981), 41, 3543—3545.
- [5] Piette J., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, (1984), 781, 257—264.
- [6] 董苍玉等, 《生物化学杂志》, (1987), 5, 468—473.
- [7] 贾弘提等, 《生物化学杂志》, (1989), 5(3), 275—280.
- [8] 付毅平等, 《生物化学杂志》, (1989), 5(5).
- [9] Straight R.c. and Spikes J.D., in *Singlet O₂*, (1985), Vol. IV, (Frimet A. A. ed) pp 91—128, CRC Press.

Hypocrellin A-sensitized Photooxidation of pBR 322 DNA Resulting in Strand Scission to Open Circular DNA

Jia, Hong-ti Fu, Yi-ping Dong, Caug-yu

(Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing)

Abstract The photooxidation of pBR 322 DNA sensitized by Hypocrellin A resulted in the conversion of closed circular DNA to open circular DNA. This result showed that strand scission of pBR 322 DNA might occur in this photooxidation. Singlet oxygen quencher—NaN₃ could protect DNA from strand scission suggesting that Type II process was involved in Hypocrellin A-sensitized photooxidation of pBR 322 DNA.

Key words: Hypocrellin A Photooxidation of DNA Singlet Oxygen