

## keV 离子辐照固态腺嘌呤与胞嘧啶的剂量效应研究

石怀彬, 邵春林, 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 研究了经 20keV 的氩离子、氦离子辐照后, 腺嘌呤与胞嘧啶的残存率与注入剂量的关系。结果表明, 在相同的剂量下, 氩离子对碱基的损伤比氦离子高, 而对同种离子而言, 胞嘧啶比腺嘌呤表现出较高的辐射敏感性。计算了碱基分子损伤的 G 值, 发现它们随剂量的增大呈减小的趋势; 考察了加入自由基清除剂后, 碱基损伤剂量效应的变化。并对上述结果提出了初步的解释。

**关键词:** 离子辐照; 腺嘌呤; 胞嘧啶; 剂量效应

**中图分类号:** Q691.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0731-05

低能离子辐照, 作为一门新兴的科学技术, 已被成功地应用于生物诱变、细胞加工和基因工程等多个方面<sup>[1-3]</sup>。目前, 对其机理的研究主要集中在细胞和个体水平上<sup>[4,5]</sup>, 分子水平上的辐照损伤研究也取得一定的进展<sup>[6-9]</sup>。但关于核酸碱基在离子束作用下损伤的剂量效应研究的还很少。由于核酸是生物体辐照损伤的主要靶分子, 而它的损伤又主要表现为碱基的损伤。为此, 本文利用高压液相色谱, 研究了固态腺嘌呤和胞嘧啶在不同条件下损伤的剂量效应, 为揭示低能离子与生物碱基作用时的定量关系提供一些基本信息。

### 1 实 验

#### 1.1 样品制备

配制一定浓度腺嘌呤 (AMRESCO 公司产品, 层析纯) 与胞嘧啶 (AMRESCO 公司产品, 层析纯) 水溶液, 各取 5ml 平铺于两只  $\Phi 9\text{cm}$  玻璃平皿上, 于  $40^\circ\text{C}$  烘箱中干燥成薄膜, 其中腺嘌呤含量为  $0.12\text{mg}/\text{cm}^2$ , 胞嘧啶含量为  $0.1\text{mg}/\text{cm}^2$ 。另配同样浓度腺嘌呤与胞嘧啶水溶液, 并加入少量甲酸钠 (摩尔数分别为腺嘌呤和胞嘧啶的 10%), 按同样方法制成薄膜。

#### 1.2 离子辐照

在本所研制的大功率、大束斑 ( $\Phi 20\text{cm}$ 、空间均匀性好于 95%)、强流 ( $20\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) 离子注入机上, 采用脉冲 (脉宽 10s, 间隔 20s) 方式注入, 离子能量 20keV, 束流 20mA, 每次脉冲剂量为  $D_0 = 10^{15}\text{ions}/\text{cm}^2$ 。

#### 1.3 样品分析

将离子辐照后的样品溶于 5ml 水中, 以未辐照溶液为对照 (先制成薄膜, 再溶于水), 通过高压液相色谱测量样品及对照中碱基的吸收峰面积, 由朗伯-比耳定律 (Berrio-Lamberti regular) 计算出样品中残留的碱基含量, 结果取三次实验值的平均值。色谱条件: Waters 600 型高压液相色谱仪, SymmetryShield<sup>TM</sup> 色谱柱 ( $3.9 \times 150\text{mm}$ ), 流动相: 30% 甲醇水溶液,

收稿日期: 2001-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29772033)

作者简介: 石怀彬, 1971 年生, 讲师, 博士, 电话: (0551)5591602, E-mail: Shihuaibin@sina.com.

流速:1.0ml / min,紫外检测波长 270nm。峰面积计算由 Millennium<sup>32</sup> 软件自动完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 离子注入对腺嘌呤与胞嘧啶的损伤

腺嘌呤与胞嘧啶受不同剂量  $N^+$ 、 $Ar^+$  辐照后的残留率与注入剂量的关系分别如图 1、2 所示。可见,随注入剂量的增加,样品的残留率逐渐下降,但下降的速度愈来愈慢,后者在碱基分子损伤的 G 值(每注入 100eV 能量导致碱基的损伤数)计算结果(表 1)中反映的更加明显。这是因为,一方面,在离子注入靶体系后,可与多个靶分子发生碰撞,并通过级联碰撞逐渐丧失能量,其中有些能量可造成靶分子的损伤,但在碰撞过程中,大多数的能量则因不足以损伤靶分子而“浪费”了,而且,随着剂量的增加,这种影响愈加明显,结果导致 G 值下降;另一方面,由于大量离子的入射,样品表面的靶分子可能受到多个离子的轰击,以腺嘌呤为例:已知腺嘌呤分子的大小约为  $40\text{\AA}^2$ ,垂直于注入方向的每个腺嘌呤分子的有效面积约为  $10\text{\AA}^2$ ,如辐照剂量为 10D<sub>0</sub>,则样品表面一个腺嘌呤分子至少会受到 10 个离子的轰击<sup>[10]</sup>,即大量的注入离子轰击的仅是已经损伤的靶分子,而对样品深层靶分子作用较小,随着注入剂量的增加,这种情况更加严重,表现为 G 值随剂量增加而逐渐减小。

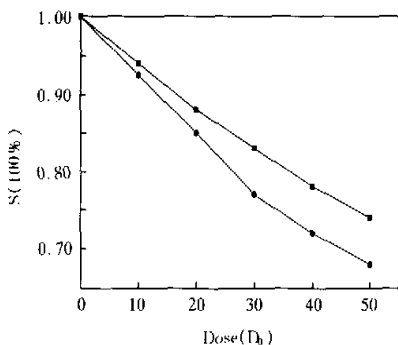


Fig.1 The residual activities of A irradiated by 20 keV  $N^+$  and  $Ar^+$  respectively (●  $N^+$ , ■  $Ar^+$ )

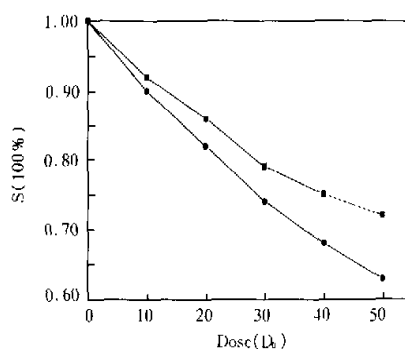


Fig.2 The residual activities of C irradiated by 20keV  $N^+$  and  $Ar^+$  respectively (●  $N^+$ , ■  $Ar^+$ )

Table 1 The G - values of the damaged A and C irradiated by  $N^+$  and  $Ar^+$

Dose(D <sub>0</sub> )	G (-A) × 100		G (-C) × 100	
	$N^+$	$Ar^+$	$N^+$	$Ar^+$
10	2.00	1.60	2.72	2.17
20	1.94	1.60	2.43	1.89
30	1.96	1.52	2.35	1.89
40	1.87	1.47	2.16	1.67
50	1.71	1.43	1.94	1.50

另外,由图 1、2 可以看出,在相同剂量条件下,  $N^+$  对碱基的损伤比  $Ar^+$  高,这种差别受两个方面因素的影响。一方面,由于  $N^+$  比  $Ar^+$  质量数小,在相同能量的情况下,前者的纵向作用深度(射程)较长,可以与更多的靶分子发生直接作用;另一方面,  $Ar^+$  比  $N^+$  的阻止本领大,尤其是发生弹性碰撞的核阻止本领很大,能造成高密度的级联碰撞,产生更多的反冲原子,这些反冲原子作为次级辐射源进一步作用于其周围的靶分子,也就是说,  $Ar^+$  在入射样品的径迹上,由于级联碰撞所形成的横向作用范围比  $N^+$  大。这两个方面综合作用的结果使  $N^+$  与  $Ar^+$  对碱基的损伤能力比  $Ar^+$  强<sup>[11]</sup>。

### 2.2 腺嘌呤与胞嘧啶对离子辐照敏感性的差异

综合图 1、2 可以看出,对于同一剂量的同种离子而言,胞嘧啶比腺嘌呤表现出较高的辐射敏感性(见图 3、4)。这可能与碱基分子的结构有关:在腺嘌呤和胞嘧啶中,氨基-一体化为共振系统,腺嘌呤分子轨道中最高占据轨道的能量为 532.55eV,而对胞嘧啶而言,最高占据轨道的能量为 565.42eV<sup>[12]</sup>,即胞嘧啶的分子不如腺嘌呤稳定,因而易受外来能量的损伤,辐射敏感

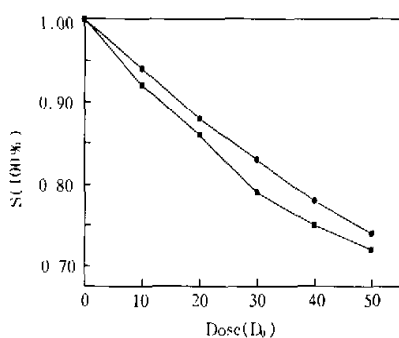


Fig. 3 The residual activities of A (■) and C (●) irradiated by 20 keV  $Ar^+$

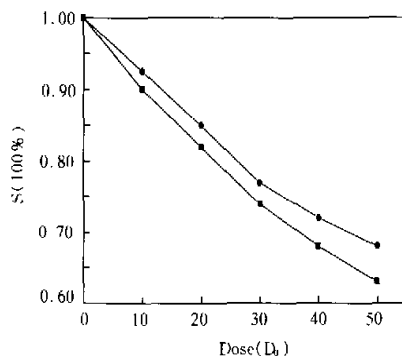


Fig. 4 The residual activities of A (■) and C (●) irradiated by 20 keV  $N^+$

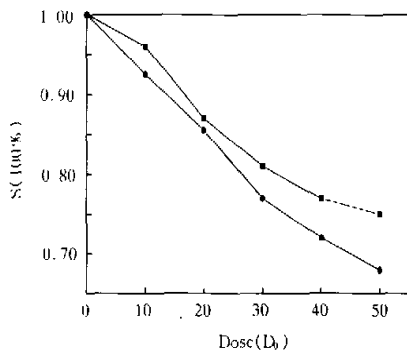


Fig. 5 The residual activities of A irradiated by 20keV  $N^+$  with (■) and without (●) the presence of radical eliminator

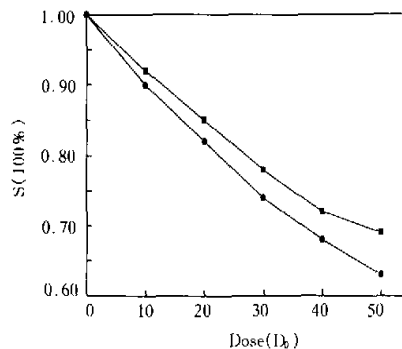


Fig. 6 The residual activities of C irradiated by 20keV  $N^+$  with (■) and without (●) the presence of radical eliminator

性较高。

### 2.3 自由基清除剂的影响

甲酸钠是常用的自由基清除剂,它对腺嘌呤和胞嘧啶损伤剂量效应的影响见图5、6。可见,少量自由基清除剂的存在可显著地降低低能离子对碱基的损伤,而且随着剂量的增大,这种作用逐渐增强。这说明在实验条件下,外来离子对碱基的损伤主要是通过自由基反应的历程实现的。自由基反应的特点是一经引发,随即产生连锁反应,生成大量自由基,随着剂量的加大,靶中的自由基数目迅速增加,因而加重对碱基的损伤。而甲酸钠对自由基具有“淬灭”作用,而且自由基越多,清除效能越明显,表现为对碱基的“保护”能力越强,即清除剂对损伤的减弱作用愈加显著。

## 3 结 论

低能  $N^+$  与  $Ar^+$  作用于生物碱基时,一方面通过直接作用传递能量于靶分子,使其受到损伤,另一方面,弹性碰撞产生的反冲原子也会造成靶分子的损伤,辐射引起的自由基对碱基的损伤亦有一定的贡献,这些方面共同作用的结果使  $N^+$  比  $Ar^+$  具有较强的损伤能力。随注入剂量的加大,靶分子损伤的 G 值逐渐减小。自由基清除剂的存在能有效降低入射离子对靶分子的损伤,且随剂量增加,这种“保护”作用愈加明显。

### 参考文献:

- [1] Yu Zengliang. Ion beam Application in Genetic Modification[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2000, 28(1):128-132.
- [2] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科技出版社, 1998. 176-190.
- [3] 余增亮. 离子束与生命科学[J]. *物理*, 1997, 6:333-338.
- [4] Yu Zengliang, Deng Jianguo, Han Jianjun, et al. Mutation breeding by ion implantation[J]. *Nucl Instru Meth Phys Res*, 1991, B59/60:705-708.
- [5] Yang Jianbo, Wu Lijun, Li Li, Wu Jiadao, et al. Sequence analysis of lacZ- mutations induced by ion beam irradiation in double-stranded M13mp 18DNA[J]. *Science in China*, 1997, 40(1):107-112.
- [6] Yu Zengliang, Shao Chunlin. Dose-effect of the tyrosine sample implanted by a low energy  $N^+$  ion beam[J]. *Radiat Phys Chem*, 1994, 43(4):349-351.
- [7] Shao Chunlin, Wang Xiangqin, Yu Zengliang. Phosphate release from  $N^+$  irradiated 5'-CMP and its kinetics[J]. *Radiat Phys Chem*, 1997, 50(6):561-565.
- [8] Shao Chunlin, Yu Zengliang. Mass deposition in tyrosine irradiated by a  $N^+$  ion[J]. *Radiat Phys Chem*, 1997, 50(6):595-599.
- [9] Huang Weidong, Yu Zengliang, Zhang Yuheng. Reactions of solid glycine induced by keV ion irradiation[J]. *Chemical Physics*, 1998, 237-223-231.
- [10] 刘次全, 白春礼, 张静. 结构分子生物学[M], 北京:高等教育出版社, 1997. 20.
- [11] 黄卫东, 邵春林, 余增亮. 低能离子辐照苏氨酸质量沉积方式的研究[J], *核技术*, 1996, 19(2):746-748.
- [12] 永田亲义, 陶宗晋, 江寿平. 量子生物学入门[M]. 上海:上海科技出版社, 1979. 38.

**DOSE EFFECT OF keV IONS IRRADIATION ON ADENINE AND CYTOSINE**

SHI Huai-bin, SHAO Chun-lin, YU Zeng-liang

*(Institute of Plasma Physics, Academia Sinica, hefei 230031, China)*

**Abstract:** Dose effect of adenine and cytosine irradiated by 20 keV N<sup>+</sup> and Ar<sup>+</sup> was studied. It was found that N<sup>+</sup> can damage more base molecules than Ar<sup>+</sup> at the same dose, and cytosine shows a higher sensitivity than adenine irradiated by the same kind of ion. G-values of the damaged bases were calculated, and they presented a decreasing tendency with the dose increasing. The influence of radical eliminator on dose effects was investigated, and preliminary explanations to all these results were provided as well.

**Key Words:** Ion implantation; Adenine; Cytosine; Dose effect