原子力显微镜观测紫外线诱导的K562肿瘤细胞 DNA损伤

刘颖[1] 齐浩[1,2] 孙润广[1] 陈文芳[1] 郭伟[2]
([1]陕西师范大学物理与信息技术学院生物物理与生物医学工程研究室,西安 710062;[2]陕西师范大学生命科学学院细胞教研室,西安 710062)

摘 要: 利用彗星电泳检测出 UVB、UVC短时间照射会使肿瘤细胞的 DNA发生断裂,而长时间照射之后彗星电泳无法检测到碎片,推测可能是由于 DNA分子交联的原因[1],国内外尚无定论。为了更直观的研究这种现象,提取了 UVB,UVA照射后 K562细胞的 DNA,并调节到合适的浓度在原子力显微镜下观测。实验结果表明 UVB对 K562肿瘤细胞 DNA损伤的影响呈现时间 /剂量效应,较短时间照射主要产生 DNA的链断裂,较长时间辐射则主要产生 DNA链的交联。UVC对 K562肿瘤细胞 DNA的损伤大于 UVB。UVC短时照射即可引起 DNA的断裂和交联,较长时间辐射主要产生交联和一些断裂;长时间照射不但产生大量交联,同时有大量断裂产生,并发生凝缩和缠绕等结构破坏。

关键词: 原子力显微镜 UVB UVC DNA断裂 DNA交联

Observation of the DNA Extracted from K562 Cells Exposed in Ultraviolet Light by Atomic Force Microscopy

Liu Ying[1] Qi Hao[1,2] Sun Runguang[1] Chen Wenfang[1] Guo Wei[2]
([1] *Shanxi Normal University, Department of Physics, Biophysics Laboratory, Xi'an* 710062;
[2] *Shanxi Normal University, Department of Biology, Xi'an* 710062)

Abstract: The partner of the laboratory that the author stayed use the comet assay detect UVB, UVC radiation cause the broken of DNA in a short period. But after a long time the comet assay could not detect the phenomenon, we suppose that results was due to the DNA molecules cross-linked. In order to explain this phenomenon much more directly, and also give a correct model of DNA observation, DNA from the K562 cells was extracted that exposed in the UVB, UVC. The result indicatd that DNA damage increase as the dose of UVB, UVC increasing. In a short time, some of DNA of K562 cells exposed in UVB appeared to break to fracture. After a long time, majority of DNA appeaed to be cross-linking. UVB affected on DNA was much greater than UVB. Majority of DNA of K562 cells exposed in UVC for a short time appear to break and cross-link. Thus, it proves that long time exposure cause DNA molecules appear to winding and condensation, with other DNA damage.

Key words: Atomic force microscopy UVB UVC Break of DNA Cross-link of DNA

原子力显微镜 (AFM)问世以后在生物大分子表面结构和功能的研究中得到了很大的应用,特别是在 DNA的结构和功能研究方面[2~9]。1992年,Bustamante等[10]用原子力显微镜在室温和干燥空气条件下得到质粒 DNA的图像,所获得的 DNA图像重复性好并且分辨率可达纳米水平,能够清晰地观测到三维环状 DNA分子结构,并可估算分子的宽度和高度。这是原子力显微镜研究生物大分子的一个重要进展,使用 AFM可在多种条件下获得单链、双链、三链的 DNA分子图像[11~13],例如,Peter等[14]就利用 AFM清晰地观察到了体外生理状态下各种 DNA分子的三维结构。

收稿日期: 2008-12-15
基金项目:陕西省科技计划项目 (2006C$_2$34)
作者简介:刘颖 (1981-),女,新疆石河子市人,在读博士,主要从事膜与细胞生物物理学研究; E-mail: 8110131846@sina.com
通讯作者:孙润广 (1958-),男,陕西省延安市人,教授,博士,主要从事膜与细胞生物物理学的研究; E-mail: sunrun@pub.xaonline.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DNA研究的关键问题是如何解决DNA在基底表面的聚集问题,及如何增加DNA分子在基底表面的粘附性。研究者们在如何利用原子力显微镜更好的观测DNA的方法学领域进行了大量研究。蔡民辉等[15]分别采用APS云母和纯云母作为衬底,通过试验开发了两种对DNA及其碎片进行长度测量和统计分析的制样方法。这两种方法不仅丰富了DNA样品制备方法,对推广AFM在生物领域中的应用也具有重要意义。何晓燕等[16]观察了DNA分子在硅、云母及修饰过的云母表面的沉积与扩展,并对3种情况下DNA的扩展情况进行了比较。试验结果表明,DNA分子在修饰过的云母上所得到的AFM图像比在硅片、云母片上的扩展更容易,且图像稳定性好,可重复性高。祭美菊等[17]利用AFM观测了DNA分子在化学修饰云母片上的图像,这种化学修饰可使云母表面带有正电荷,使DNA分子不易从基底脱落。于利华等[18]发展了一种新的DNA固定方法,即采用镍邻菲绕啉来修饰基底以便固定DNA,取得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 仪器 原子力显微镜(日本岛津公司),型号:SPM-9500J3(WET CNⅡ),Si3N4 AFM探针,微悬臂长200 μm,弹性系数为0.12 N/m;倒置显微镜(Nikon公司),型号:Nikon TE2000-S;高速冷冻离心机:德国Eppendorf公司(5417C);直流稳压电源由西北大学物理系提供;UV照射装置:紫外消毒灯;ZSZ～20型石英紫外线杀菌灯,20 W,购自天津市紫晶特种灯源有限公司。

1.1.2 细胞 K562细胞培养在RPMI 1640 + 10%小牛血清(体积分数) + 100 U双抗(青、链霉素)的培养基中培养;小鼠肝癌细胞Hepa1-6在DMEM + 10%小牛血清(体积分数) + 100 U双抗(青、链霉素)的培养基中培养;小鼠原代肝细胞在80% William's E + 20%胎牛血清(体积分数) + 100 U双抗(青、链霉素) + 胰岛素(2.5 μg/ml) + 地塞米松(0.4 μg/ml) + 2 mmol/L L谷氨酰氨的培养基中培养,置5% CO_2、37℃、饱和水蒸气条件下培养。细胞生长至对数期时用于试验;原代细胞生长至3～5代时用于试验。

1.1.3 试剂 DNA提取试剂盒,北京天为时代科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞DNA提取方法 K562细胞离心收集后,利用DNA提取试剂盒提取DNA,紫外分光光度法测量其浓度。细胞DNA来源于陕西师范大学生命科学学院细胞教研室。

1.2.2 细胞DNA样品的观测方法 将DNA溶液依次稀释至浓度:10、0.33和0.03 μg/ml,用移液器取出10 μl稀释后的DNA溶液,缓缓地滴于新解离的云母衬底上,将样品置于阴凉干燥处,使残留在衬底上的水分自然晾干,然后将云母片粘贴于载物片上,并固定在原子力显微镜的观测台上,大气下用原子力显微镜进行观测。contact模式观察,扫描频率1.0～1.5 Hz。

1.2.3 UVB、UVC处理K562细胞的试验方法及分组 分别选用UVB,UVC作为紫外照射源进行处理,照射功率均为40 μW / cm^2,照射时间分别为25 s,100 s,5 min,对照组细胞不进行照射。照射完成后立刻收集细胞,利用DNA提取试剂盒提取DNA,紫外分光光度法测定DNA浓度后将其制成30 ng/ml溶液,滴加于云母片上进行观测。

2 结果

2.1 不同浓度DNA的AFM观测结果

图1-A、图1-B和图1-C分别是浓度为10 μg/ml,0.33 μg/ml,0.03 μg/ml的DNA滴加在云母表面的AFM图像。图像上的DNA呈现3种不同的状态:当浓度为10 μg/ml时,DNA聚集在一起呈现一种膜片状结构,AFM图像中出现高亮区域(图1-A);当浓度为0.33 μg/ml时,DNA呈现网状结构(图1-B);当浓度为0.03 μg/ml时,DNA呈现独立的链状结构(图1-C)。

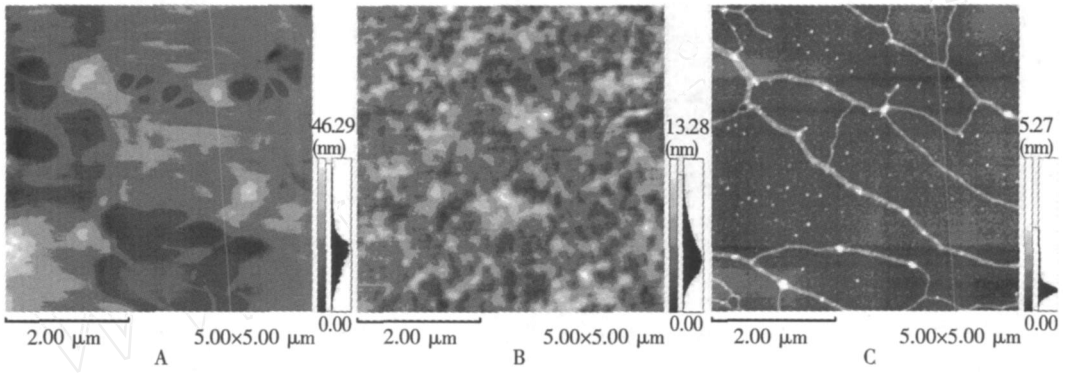
2.2 AFM观察UV损伤的细胞DNA

2.2.1 不同剂量UVB处理K562细胞后的DNA结构变化结果 图2和图3显示K562细胞经UVB照射25 s后,其DNA结构与对照组相比,未发生明显变化(图2-B,图2-C);经UVB照射100 s后,细胞DNA出现大量断裂和交联(图2-C),放大后观察发现DNA呈网络状结构并有大量的DNA碎片存在(图3-C);经UVB照射5 min后,大范围扫描时,可

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

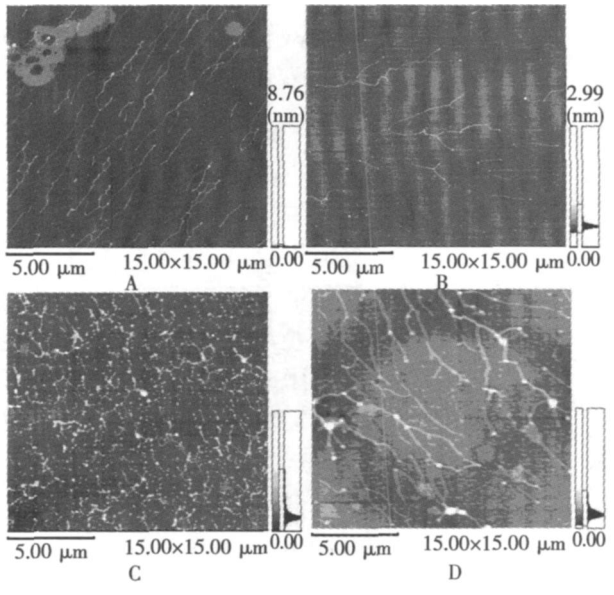
见长度较短的 DNA片段 (图 2-D),同时 DNA的链间发生严重交联 (图 3-D)。

2.2.2　不同剂量 UVC处理 K562细胞后,其 DNA结构变化情况　图 4和图 5显示 K562细胞经 UVC照射 25 s后,其 DNA结构与对照组相比,发生少量的断裂和交联 (图 4-B,图 5-B);经 UVC照射 100 s后,细胞 DNA出现明显的链间交联,同时可见 DNA链变粗 (图 4-C,图 5-C),链上出现大的结点,呈现类似串珠状的结构 (图 5-C);UVC照射 5 min后,大范围扫描时,DNA发生严重断裂,部分断片互相交联 (图 4-D),图像放大后可见 DNA链变得较细,链之间的交联呈现团块状结构 (图 5-D),疑似断裂 DNA的聚集。



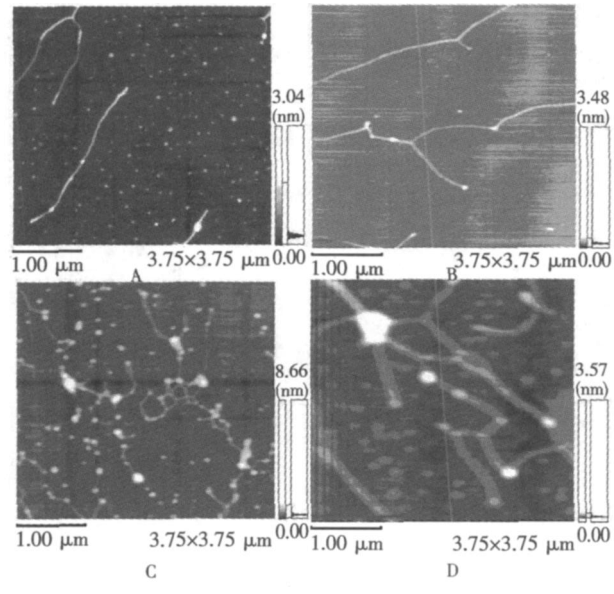
A. DNA浓度为 10 μg/ml; B. DNA浓度为 0.33 μg/ml; C. DNA浓度为 0.03 μg/ml

图 1　不同浓度 DNA滴加在云母表面的 AFM图像 (扫描范围:5 μm ×5 μm)



A. 对照组; B. UVB照射 25 s;
C. UVB照射 100 s; D. UVB照射 5 min

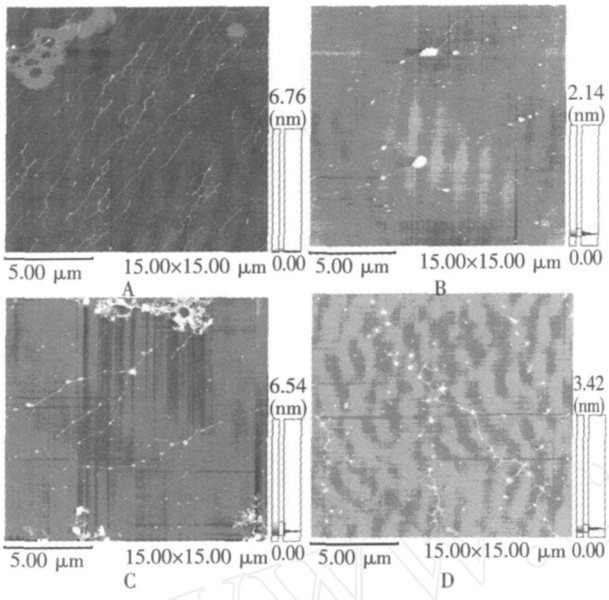
图 2　不同剂量 UVB处理 K562细胞后 DNA结构变化的 AFM图像 (扫描范围:15 μm ×15 μm)



A. 对照组; B. UVB照射 25 s;
C. UVB照射 100 s; D. UVB照射 5 min

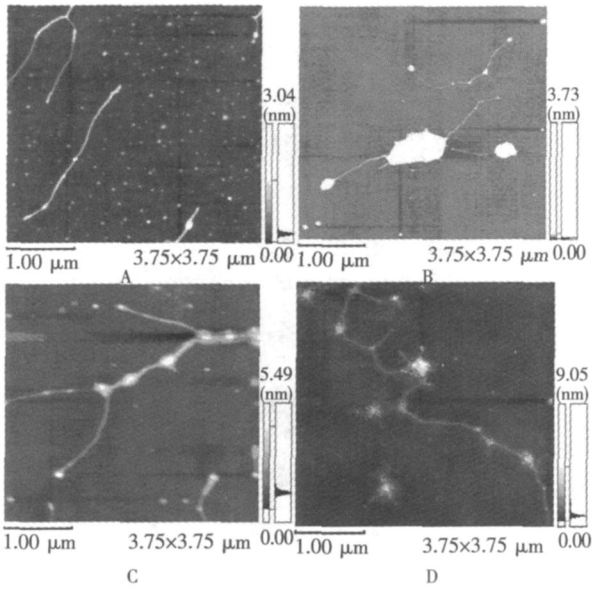
图 3　不同剂量 UVB处理 K562细胞 DNA结构变化 AFM图像 (扫描范围:3.75 μm ×3.75 μm)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A. 对照组; B. UVC照射 25 s; C. UVC照射 100 s; D. UVC照射 5 min

图 4 不同剂量 UVC处理 K562细胞 DNA结构变化 AFM 图像 (扫描范围 : 15 μm ×15 μm)



A. 对照组; B. UVC照射 25 s; C. UVC照射 100 s; D. UVC照射 5 min

图 5 不同剂量 UVC处理 K562细胞 DNA结构变化 AFM 图像 (扫描范围 : 3. 75 μm ×3. 75 μm)

3 讨论

若用 AFM 观察 DNA 的结构,应将溶液中的 DNA浓度调整到 0. 03 μg/ml左右 (图 1-C)才能得到 DNA分散良好的图像,才可清晰地观察 DNA结构的变化。试验结果表明细胞 DNA的损伤以及损伤类型与 UVB的辐射剂量相关。低剂量的损伤较弱,而中等剂量 (100 s连续辐射)则主要发生的是断裂和交联。在长时间照射积累了相当大的辐射剂量后,细胞 DNA的损伤主要是交联的发展,表现为增多的 DNA链间的交联,同时伴随有 DNA链的加粗和断裂。从 AFM 观察到的 DNA损伤随照射时间延长的破坏趋势提示,UVB对 K562细胞 DNA的损伤有时间 /剂量依赖效应,长时间的照射主要造成 DNA链的交联。UVB是能够穿越臭氧层到达地面的日光辐射伤害因子之一,通常可引起所谓的日照损伤,引发皮肤癌的产生。使用 AFM 观察 UVB对细胞 DNA的损伤,可以了解 UVB辐射对细胞 DNA损伤的剂量 /时间效应。

细胞应答 UVC辐射的模式类似于 UVB,都是随着照射时间的延长而 DNA结构的破坏增强。但从实验结果来看, UVC对细胞 DNA的损伤要大于 UVB。当 UVC照射细胞 100 s后, AFM 观察到细胞 DNA出现大量的片段和一些交联,放大后的图像显示 100 s的辐射使细胞 DNA链增粗并有交联。如果细胞接受了 5 min的 UVC照射, AFM 可观察到细胞 DNA大都形成碎片,也有大量交联产生。图像进一步放大后可见损伤的 DNA凝缩缠绕形成放射状的结构,与图 5-C相比, DNA链变细,且发生断链的交联和凝缩。

虽然 DNA损伤随辐射时间的延长而加剧,但是不同波段的 UV对细胞 DNA造成的破坏不同。短时间照射时, UVB主要产生 DNA的断裂,长时间辐射则在 DNA的链间产生交联; UVC则在短时间辐射时即有损伤,稍长时间辐射主要产生细胞 DNA链间的交联,长时间辐射则出现交联、断裂和缠绕凝缩。试验结果提示, UVC的辐射破坏性要远远大于 UVB,这一现象与两种类型 UV的辐射能量是正相关的。

4 结论

原子力显微镜观测 DNA结构时,需要将溶液中 DNA浓度调节至合适浓度,推荐的观察浓度为 0. 03 μg/ml。在稀释 DNA样品时,注意避免操作不当而导致的 DNA断裂。

UVB对 K562细胞 DNA损伤的影响呈现时间 /

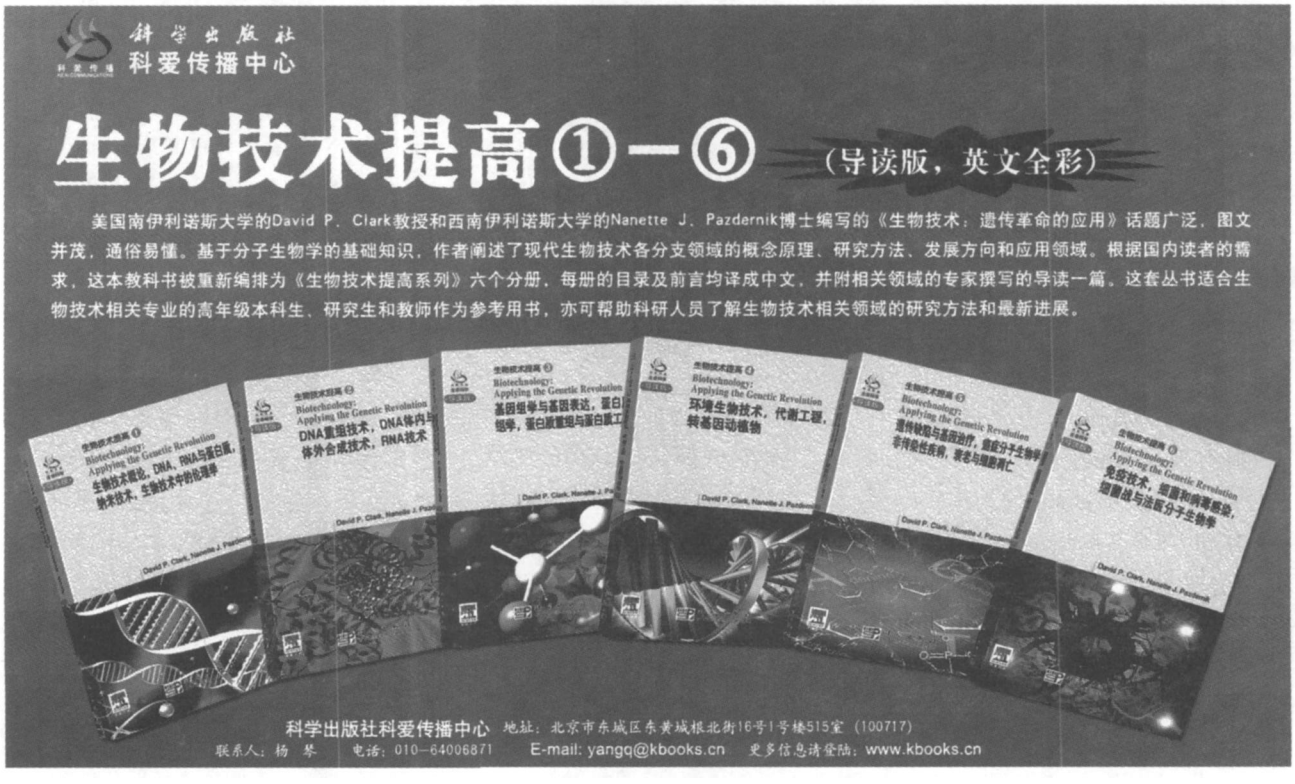
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

剂量效应,较短时间照射主要产生 DNA的链断裂,较长时间辐射则主要产生 DNA链的交联。

UVC对 K562细胞 DNA的损伤大于 UVB。UVC短时照射即可引起 DNA的断裂和交联,较长时间辐射主要产生交联和一些断裂;长时间照射不但产生大量交联,同时有大量断裂产生,并发生凝缩和缠绕等结构破坏。

参 考 文 献

1 罗明志,齐浩,陈文芳,等. 癌变、畸变、突变, 2006, 18(5): 400～403.
2 申梓刚,李海,王化斌,等. 现代仪器, 2007, 13(1): 19～20.
3 袁明秀,张志宏,等. 中国科技导报, 2005, 23(12): 20.
4 马豫峰,蔡继业,赵秋香,等. 南方医科大学学报, 2006, 26(10): 1427～1430.
5 Keren K, Berman RS, Braun E. Nano Lett, 2004, 4(2): 323～326.
6 Nakao H, Shiigi H, Yamamoto Y, et al. Nano Lett, 2003, 3(10): 1391～1394.
7 Kaji N, Ueda M, Baba Y. Biophys J, 2002, 82(1): 335～344.
8 Kim JM, Ohtani T, Park JY, et al. Ultramicroscopy, 2002, 91(1～4): 139～149.
9 张益,陈圣福,欧阳振乾,等. 科学通报, 2000, 45(5): 490～493.
10 Bustamante C, Vesonka J, Tang CL, et al. Biochemistry, 1992, 31(1): 22～26.
11 Wu AG, Li Z, Yu LH, et al. Anal Sci, 2001, 17(5): 583～584.
12 Tiner WJ Sr, Potaman VN, Sinden RR, et al. J Mol Biol, 2001, 314(3): 353～357.
13 Bolshakova AV, Kiselyova OL, Filonov AS, et al. Ultramicroscopy, 2001, 86(1～2): 121～128.
14 Hoyt Peter, Doktycz MJ, Warmack RJ, et al. Ultramicroscopy, 2001, 86(1～2): 139～143.
15 蔡明辉, 赵葵, 展永,等. 电子显微学报, 2006, 25(1): 76～79.
16 何晓燕,倪刚,薄丽丽,等. 西北师范大学学报, 2005, 41(3): 49～51.
17 祭美菊,侯鹏,沈佳尧,等. 高等学校化学学报, 2003, 24(9): 1621～1623.
18 于力华,李壮,吴爱国,等. 高等学校化学学报, 2002, 23(1): 46～48.



© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net