



## 基于大肠杆菌的重离子辐射靶点序列定位和*LacI*突变分析的实验体系构建及验证

金铭 王婷 刘斌美 卞坡

### Construction and Validation of Experimental System for Heavy ion Radiation Targeted Loci Localization and *lacI* Mutation Analysis Based on Escherichia Coli

JIN Ming, WANG Ting, LIU Binmei, BIAN Po

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.40.2022034>

引用格式:

金铭, 王婷, 刘斌美, 卞坡. 基于大肠杆菌的重离子辐射靶点序列定位和*LacI*突变分析的实验体系构建及验证[J]. *原子核物理评论*, 2023, 40(1):113–120. doi: 10.11804/NuclPhysRev.40.2022034

JIN Ming, WANG Ting, LIU Binmei, BIAN Po. Construction and Validation of Experimental System for Heavy ion Radiation Targeted Loci Localization and *lacI* Mutation Analysis Based on Escherichia Coli[J]. *Nuclear Physics Review*, 2023, 40(1):113–120. doi: 10.11804/NuclPhysRev.40.2022034

---

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### [A~80核区在束谱学研究进展](#)

Progress on the Spectroscopy in the A~80 Mass Region

原子核物理评论. 2020, 37(1): 11–17 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.37.2020001>

#### [GeV能区碰撞中正反质子椭圆流劈裂的研究](#)

Investigation of the Splitting in Elliptic Flow Between Protons and Anti-protons in + Collisions at

原子核物理评论. 2020, 37(3): 660–667 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.37.2019CNPC04>

#### [基于SiPM双端读出的 \$\gamma\$ 射线探测器研究](#)

Study of the  $\gamma$ -Ray Detector of Dual-ended Readout Based on SiPM

原子核物理评论. 2020, 37(3): 757–764 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.37.2019CNPC03>

文章编号: 1007-4627(2023)01-0113-08

## 基于大肠杆菌的重离子辐射靶点序列定位 和 *LacI* 突变分析的实验体系构建及验证

金铭<sup>1,2</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 刘斌美<sup>1</sup>, 卞坡<sup>1,†</sup>

(1. 中国科学院合肥物质科学研究院智能机械研究所, 合肥 230031;  
2. 中国科学技术大学, 合肥 230027)

**摘要:** 重离子辐射具有独特的物理和生物学特性, 在诱变育种等领域有着广泛的应用, 但其诱变的机制并不完全清楚。不同于传统的 X 和  $\gamma$  射线, 重离子辐射具有较高的线传能密度 (Linear energy transfer, LET), 主要诱导团簇状的 DNA 损伤, 其演化为遗传变异的过程更为复杂, 突变类型也更难预测。目前的实验技术很难在序列水平对重离子击中 DNA 的靶点进行定位, 这致使重离子辐射诱变机制的研究相对滞后。针对这一问题, 根据重离子辐射诱导的团簇损伤核心区域富含 DNA 双链断裂 (Double-strand break, DSB) 以及同源重组机制对 DSB 特异性响应的特性, 首先构建了四环素抗性基因 (*TetA*) 同源重组元件用于确定 DNA 团簇损伤的序列定位, 并在重组原件侧翼连接反向突变筛选基因 *LacI* 用于团簇损伤—突变的检测, 最后将该质粒转化到大肠杆菌 *E.coli*。在此基础上, 比较分析  $\gamma$  射线与碳重离子 (80 MeV/u) 辐照后同源重组和报告基因突变的情况, 验证了该体系用于重离子辐射靶点序列定位及突变检测的可行性, 为进一步研究重离子辐射诱变的相关机制奠定了方法学基础。

**关键词:** 重离子;  $\gamma$  射线; 同源重组; 团簇损伤

**中图分类号:** Q691 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.40.2022034

### 0 引言

不同于传统的 X、 $\gamma$  等射线, 重离子辐射具有独特的物理和生物学特征, 主要包括线传能密度 (Linear Energy Transfer, LET) 高, 能量沉积的射程分布为 Bragg 曲线等<sup>[1]</sup>。重离子在击中 DNA 的靶点区域时通常诱发复杂的团簇型损伤, 即在有限的空间内产生多位点、多类型的 DNA 损伤, 进而诱发显著的生物学效应<sup>[2]</sup>。重离子辐射诱导的 DNA 团簇损伤包括多种损伤类型, 因此其修复也涉及到不同的修复机制, 当多种修复蛋白聚集在一个有限的空间时, 修复过程更容易产生“错误”, 进而产生更为复杂的突变模式<sup>[3]</sup>。辐射诱变发生在 DNA 水平, 但目前的实验方法, 如免疫荧光技术、DNA 损伤修复报告基因等只能确定重离子辐射靶点的空间位置, 尚不能在序列水平对重离子击中 DNA 的靶点进行有效的定位, 这也是相对于 X 和  $\gamma$  辐射, 重离子辐射诱变机制研究较为滞后的一个重要原因。

重离子击中 DNA 靶点时通常会产生各种类型的

DNA 损伤, 然而在团簇的中心区域富含 DNA 双链断裂 (Double-Strand Break, DSB)<sup>[4]</sup>。DSB 是辐射诱导生物学效应中最重要的原发事件, 未修复的 DSB 通常会引起遗传信息的丢失甚至导致细胞死亡<sup>[5]</sup>。针对 DSB 损伤的修复通路主要有非末端同源连接 (Non-Homologous End Joining, NHEJ) 和同源重组 (Homologous Recombination, HR) 两种。NHEJ 能够对 DSB 进行快速、有效的修复, 但 NHEJ 不需要同源 DNA 作为模板, 因此在修复过程中更容易引入突变。相对而言, HR 利用未受干扰同源的 DNA 链作为模板来修复受损的 DNA 序列, 尽管修复效率较低, 但修复精确度很高<sup>[6]</sup>。HR 又分为保守的 SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) 途径和非保守 SSA (Single-Strand Annealing) 途径, 其中前者被认为是 HR 的经典通路<sup>[7]</sup>。由于基于 HR 的报告基因构建方法和原理相对成熟, 且有多个重组报告体系被报道, 这些体系主要被用来评价各种胁迫因子诱导的 DSB 程度<sup>[8-13]</sup>。考虑到重离子团簇损伤的中心区域富含 DSB

收稿日期: 2022-03-18; 修改日期: 2022-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (12135016)

作者简介: 金铭 (1994-), 女, 河南商丘人, 硕士研究生, 从事辐射生物学效应研究

† 通信作者: 卞坡, E-mail: [bianpo@ahmu.edu.cn](mailto:bianpo@ahmu.edu.cn)

的特性<sup>[14]</sup>, 本研究提出用同源重组机制对重离子的辐射靶点进行序列定位, 并通过检测重组元件侧翼序列来分析重离子辐射靶点诱变特征的研究思路。

基于上述研究思路, 本研究主要利用大肠杆菌生长周期短, 突变检测方法成熟等优势, 构建了 *TetA* 同源重组元件用于重离子辐射诱导团簇损伤的序列定位, 并在 *TetA* 重组元件侧翼连接突变筛选基因 *LacI* 高效检测 DNA 团簇损伤演化的遗传突变。在体系构建的基础上, 利用  $\gamma$  和碳离子进行辐射处理, 检测 *TetA* 元件重组特性及侧翼 *LacI* 基因的突变情况, 初步证明上述研究思路的可行性, 为进一步研究重离子辐射诱变的相关机制提供了方法学基础。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 辐照条件

$\gamma$  辐照处理采用 BIOBEAM GM2000 型  $\gamma$  射线辐照仪 (Biobeam GM2000, Leipzig, 德国), 放射源是 <sup>137</sup>Cs 密封源, 剂量率 2.5 Gy/min。碳离子辐照 (80 MeV/u, 剂量率 20~50 Gy/min, LET 为 30 keV/ $\mu$ m) 依托中国科学院近代物理研究所重离子加速器平台 (HIRFL) 进行。

### 1.2 大肠杆菌的培养

实验所用的 *LacI* 基因缺失型大肠杆菌 (*LacI*<sup>-</sup>) 以野

生型大肠杆菌 MG1655 (中国科学院天津工业生物技术研究所惠赠) 为背景, 利用 CRISPR-cas9 技术敲除基因组 *LacI* 基因构建而成。克隆载体 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 购于北京全式金生物技术股份有限公司。*LacI* 大肠杆菌感受态细胞制备参照 Inoue“超级感受态”细胞制备的方法<sup>[15]</sup>: *LacI* 感受态细胞菌株在 LB 固体培养基 Z 字形划线, 置于 37 °C 恒温培养箱培养 12 h, 挑取单克隆到 SOB 液体培养基中, 18 °C, 180 r/min 恒温摇床培养 16 h, 测出大肠杆菌 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6, 使用低温冷冻离心机 4 °C 2 500 g 离心 10 min, 弃上清。加入适当比例的 Inoue 转化缓冲液, 4 °C 2 500 g 离心 10 min, 加入适当比例的 Inoue 缓冲液以及 DMSO, 混匀并进行分装, 制备好的大肠杆菌感受态细胞于 -80 °C 保存。

### 1.3 目的基因片段扩增及连接

使用融合聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术, 设计具有互补末端的引物 (表 1), 形成具有重叠链的 PCR 产物, 再通过 PCR 产物重叠链部分的延伸, 在不需要内切酶消化以及连接酶处理的条件下实现不同来源的 DNA 片段在体外的连接。首先构建含有同源序列的 *TetA* 基因片段, 随后将构建成功的含有同源片段的 *TetA* 基因与 *LacI* 基因片段进行连接。连接成功的片段经 PCR 验证, 并经过测序证明序列无误后进行下步实验。

表 1 融合 PCR 引物列表

引物名称	引物序列
TetA-2F	GCTTGACACTTTATCACTGATAAAC
TetA-R	TCAGCGATCGGCTCGTTG
LacI-F	ACACCATCGAATGGCGCAAAACC
LacI-R	TCACTGCCCGCTTCCAGTCGG
LacIF-TetR-R	GGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTTTCAGCGATCGGCTCGTTG
TetR-LacIF-F	CAACGAGCCGATCGCTGAACACCATCGAATGGCGCAAAACC

### 1.4 质粒的构建及转化

取连接好的 *TetA-LacI* 基因片段 5  $\mu$ L 与克隆载体 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 1  $\mu$ L 在 25 °C 的温度下进行平末端连接, 将含有连接产物的质粒转化进入 *LacI* 大肠杆菌感受态细胞, 5  $\mu$ L 的质粒转化 *LacI* 100  $\mu$ L 的感受态细胞, 冰浴 30 min, 随后 42 °C 热激 2 min, 热激过后继续冰浴 2 min, 加入 900  $\mu$ L 的液体 LB 培养基将菌液补足至 1 mL, 37 °C, 200 r/min, 培养 1 h。 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 克隆载体自身带有卡那霉素抗性, 将培养好的菌液涂至含有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基中, 37 °C 培养 12 h, 含有 *TetA-LacI* 基因片段的质粒的转化

子 *PEASY-Blunt-Tet-LacI* 可以通过卡那霉素抗性筛选获得。为了排除筛选到的单克隆为假阳性的情况, 使用克隆载体 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 的通用引物 M13F&M13R, 将在卡那霉素抗性板上筛选得到的单克隆菌落作为模板 DNA 进行 PCR 扩增并验证产物长度。

### 1.5 质粒提取

小剂量质粒抽提试剂盒购于上海生工生物股份有限公司。

将含有 *TetA-LacI* 基因片段的质粒的转化子 *PEASY-Blunt-Tet-LacI* 单克隆挑至 10 mL 含有卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养, 酶标仪检测

到菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.5 左右时, 将菌液进行分装, 分别进行  $\gamma$  100 Gy、重离子 100 Gy 的辐照。由于质粒在细胞中是高拷贝, 难以同时分析发生在同一个质粒上的 *TetA* 基因重组和 *LacI* 基因突变, 所以辐照处理后需将质粒提取并再次进行转化, 确保重组和突变的质粒能够被特异性筛选。

### 1.6 四环素 *TetA* 重组的检测

不同剂量辐照后的菌液进行提质粒并重转化后, 将含有转化子 *PEASY-Blunt-Tet-LacI* 的菌均匀地涂在添加四环素和卡那霉素抗性 (统计四环素重组细胞) 以及单独含有卡那霉素抗性的固体 LB 培养基 (统计总的细胞数) 上。未发生同源重组修复的质粒, 四环素抗性基因没有活性, 不能被四环素抗性板筛选。37 °C 培养 16 h 后, 对培养板上的单克隆进行统计。四环素重组率 ( $10^{n-m}$ ) = *TetA* 基因重组细胞数 ( $10^n$ ) / 总细胞数 ( $10^m$ )。

### 1.7 *LacI* 基因突变的检测

提取不同剂量辐照后菌的质粒并重转化后, 将含有转化子 *PEASY-Blunt-Tet-LacI* 的菌均匀地涂在含有卡那霉素抗性的 P-Gal 培养板 (统计 *LacI* 基因突变的细胞) 和单独含有卡那霉素的固体 LB 培养板 (统计总的细胞数) 上。37 °C 培养 72 h 后, *LacI* 基因发生突变, *LacZ* 产生半乳糖苷酶并分解苯基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (P-Gal) 产生半乳糖以供大肠杆菌利用, 长出正常菌落, 而 *LacI* 未发生突变的大肠杆菌由于半乳糖苷酶的表达量极少, 72 h 内不会产生可见菌落。因此用 P-Gal 作为唯一糖源的基础培养板可以用来筛选 *LacI* 突变子。将 P-Gal+Kan 抗性板上筛选得到的单克隆重新挑菌至含有卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 待菌液浑浊后, 将菌液点涂至含有 X-Gal 的 Kan+LB 培养基上, 进行蓝白斑筛选复筛, *LacI* 基因突变可以使 *LacZ* 基因正常产生  $\beta$ -半乳糖苷酶, 从而将无色化合物 X-Gal 切割成半乳糖以及深蓝色的 5-溴-4-靛蓝。对培养板上的蓝色单克隆菌落进行统计, 并测序验证。*LacI* 突变率 ( $10^{n-m}$ ) = *LacI* 基因突变细胞数 ( $10^n$ ) / 总细胞数 ( $10^m$ )。

### 1.8 *TetA* 基因同源重组及 *LacI* 基因突变的双靶点突变检测

100 Gy  $\gamma$  和碳离子辐射处理后, 提取菌液质粒并再次转化后, 将含有转化子 *PEASY-Blunt-Tet-LacI* 的菌液均匀地涂在含有卡那霉素抗性的 P-Gal 培养板上, 并统计 *LacI* 基因突变的细胞数 (P-Gal 培养板为营养缺失型培养板, 无法同时加入卡那霉素与四环素两种抗生素), 同时接种含有卡那霉素的固体 LB 培养板统计总的细胞数。37 °C 培养 72 h 后, 将 P-Gal+Kan 抗性板上筛

选得到的单克隆重新挑菌至含有卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 待菌液浑浊后, 将其接种在含有 X-Gal 的 LB+Kan+Tet 固体培养基中, 如果菌落在含有 Kan+Tet 双抗性的 LB 培养基中可以正常生长, 并且菌落呈现蓝色, 表明筛选到了 *TetA* 基因发生同源重组及 *LacI* 基因产生突变的双突变克隆, 并进行 Sanger 测序验证, 筛选得到阳性双突变克隆, 突变频率计算公式为: (*Tet* 基因重组+*LacI* 突变率)( $10^{n-m}$ ) = (*TetA*+*LacI* 突变细胞数)( $10^n$ ) / 总细胞数 ( $10^m$ )。

### 1.9 数据统计

每个辐照实验重复 3 次, 每次试验设置 3 个平行组, 试验结果统计后算得平均值。实验数据的组间差异分析均采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为统计具有显著性差异。统计和绘图均使用 Graphpad 8 软件完成。

## 2 实验结果

### 2.1 重离子辐射 DNA 损伤位点标记及突变分析体系构建

为了研究重离子诱导的团簇损伤引发的突变特征, 在 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 质粒上构建了基于 *TetA* 同源重组元件的重离子辐射 DNA 损伤位点标记及突变分析体系 [图 1(a)]。以全长 1 200 bp 的 *TetA* 基因为同源重组标记 DSB 损伤位点。*TetA* 基因的启动子在 *TetA* 起始密码子的前 200 bp 处, 5' Tet 设计片段为从起始密码子 ATG 开始到第 61 bp, 随后 *TetA* 基因碱基序列从 61 bp 处连接上相同的两段同源重复序列 Tet-RS, Tet-RS 分别设计有 300 bp (同源序列为 *TetA* 基因的 61-361 bp)、600 bp (同源序列为 *TetA* 基因的 61-661 bp)、900 bp (同源序列为 *TetA* 基因的 61-961 bp) 三个长度, 并在两段同源重复序列中间加上 T7 终止子以及一个 *IsceI* 内切酶位点 (用于是否发生重组的双重验证, 发生重组会导致 *IsceI* 内切酶位点删除)。5' Tet+Tet-RS 有启动子活性, 但是不具有 *TetA* 基因的完整序列, 而 Tet-RS+Tet3' 因为中间连接有 T7 终止子的原因, 不具有 *TetA* 基因的启动子活性, 这种结构导致 *TetA* 基因不具有活性 (*TetA*<sup>-</sup>)。辐射产生 DSB 的位点是偶发性的, 但是当 DSB 损伤位点产生于两个同源重复片段 Tet-RS 的任何一个序列上 (只有 DSB 可以导致 DNA 同源重组), 通过序列重组删除一个同源重复片段 Tet-RS 以及中间序列, 即可恢复 *TetA* 基因活性 (*TetA*<sup>+</sup>)。利用 *TetA* 同源重组报告基因可以特异性标记发生 DSB 的位点, 进一步在其侧翼序列直接连接反向突变筛选基因 *LacI*, *LacI* 基因全长 1 160 bp, 两

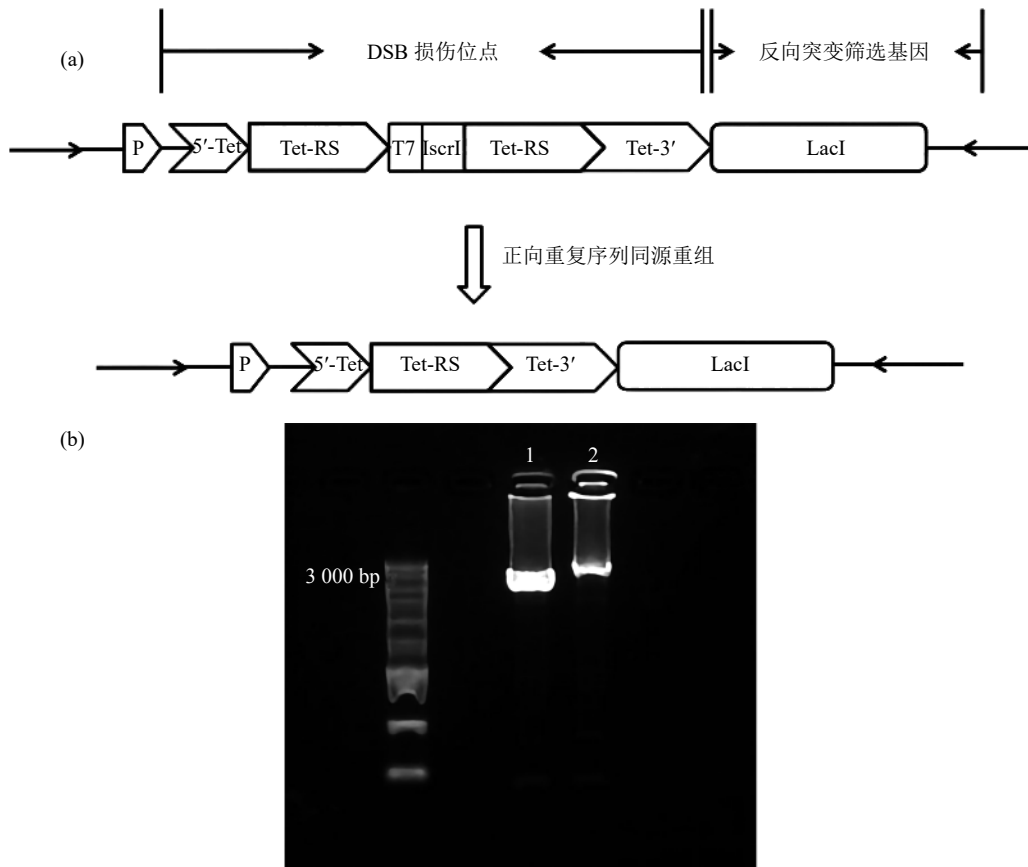


图 1 基于重复序列同源重组的反向突变筛选检测体系 (*TetA-LacI*) 的构建

(a) *TetA-LacI* 体系构建原理图, 以 Tet-RS 为 600 bp 为例; (b) *TetA-LacI* 体系序列验证。条带 1 为同源重组后的片段; 条带 2 为同源重组前的片段。

段基因序列中间无 space 片段, 用于分析 DSB 位点附近的突变情况及突变特征。并将该片段插入到 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 克隆载体的多克隆位点, 并将质粒转化到 *LacI* 缺失型大肠杆菌感受态细胞。

接下来使用克隆载体 *PEASY-Blunt Cloning Kit* 的通用引物 M13F&M13R 对插入序列进行序列验证, 首先挑选在 LB+kan 板的单克隆与 LB+Kan+Tet 筛选板上的单克隆进行 PCR 扩增并测序, 检测构建的序列重组前后的准确性。电泳结果显示单条带, 未发生同源重组的 PCR 产物片段长度应为 3 411 bp, 而发生同源重组的 PCR 产物片段长度应为 2 811 bp [图 1(b)]。测序结果显示重组前的序列构成和设计的序列一致, 而在四环素抗性筛选板上的克隆测序结果显示 *TetA* 基因恢复成正确的序列, 说明经四环素筛选到的单克隆为阳性克隆, 该结果表明同源重组报告体系的可靠性。

## 2.2 同源片段长度对同源重组频率的响应

同源重复片段长度影响同源重组的发生频率, 分别构建了 Tet-RS-300 bp、Tet-RS-600 bp 和 Tet-RS-900 bp 不同同源重复片段长度的 <sup>HR</sup>TetA 报告基因。结果显示,

随着 <sup>HR</sup>TetA 同源片段长度的增加, 自发同源重组频率也在增加, 表明片段越长, 自发 DSB 的概率增加, 同源重组频率相应增加 [图 2(a)]。 <sup>HR</sup>TetA 同源重复序列为 900 bp 时重组频率较高, 可能原因在于 *TetA* 基因全长为 1 200 bp, 而在构建同源重复序列体系时 5'-Tet 加上 900 bp 的片段已经将近 1 000 bp, 有可能部分恢复 *TetA* 基因的活性, 导致其未发生同源重组的情况下便可以在抗性板上筛选得到, 筛选的准确性显著降低。而 <sup>HR</sup>TetA 同源重复序列为 300 和 600 bp 时本底同源重组频率均较低, 在本实验中均以同源重复片段 600 bp 的 *TetA* 重组报告基因为基础。

接下来我们研究了含有同源重复片段长度为 600 bp 质粒的细胞辐射敏感性。结果显示, 大肠杆菌细胞存活率随辐射剂量的增加而呈现下降的趋势 [图 2(b)]。进一步检测不同  $\gamma$  辐射剂量下的同源重组频率, 结果发现, 辐照前期 <sup>HR</sup>TetA 同源重复序列发生同源重组的频率和辐射剂量正相关, 并在辐照剂量为 100 Gy 的时候呈现出极显著差异, 而在 150 Gy 时急剧降低, 这可能是由于辐照剂量过大对细胞引起的超杀效应引起的 [图 2(c)]。

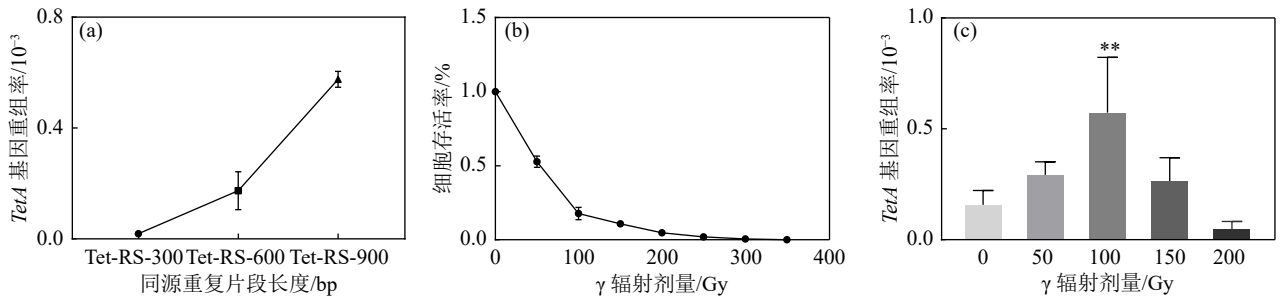


图 2 同源片段长度对辐射诱导同源重组频率的影响

(a) *TetA* 同源序列长度的自发重组率比较；(b) 细胞存活率随辐照剂量的增加而降低；(c) 不同剂量  $\gamma$  辐射对 *TetA* 基因同源重组率的影响；\*\* $P < 0.01$ 。

### 2.3 辐射品质对单独四环素 *TetA* 基因同源重组频率的影响

由于重组报告基因和反向突变筛选基因连接在质粒上，而细胞内的质粒是多拷贝的，即一个细胞中同时存在多个质粒，无法判断 *TetA* 基因发生同源重组和反向突变筛选基因 *LacI* 的突变是否发生在同一个质粒上。为了确保筛选的准确性，对辐照后的大肠杆菌细胞进行质粒提取并重新转化进入 *LacI* 缺失型大肠杆菌感受态细胞并进行 *TetA* 重组报告基因发生同源重组的筛选。经验证，质粒提取前后 *TetA* 重组率都呈现出剂量依赖性上升 [图 3(a)]，表明质粒提取步骤不影响突变分析。

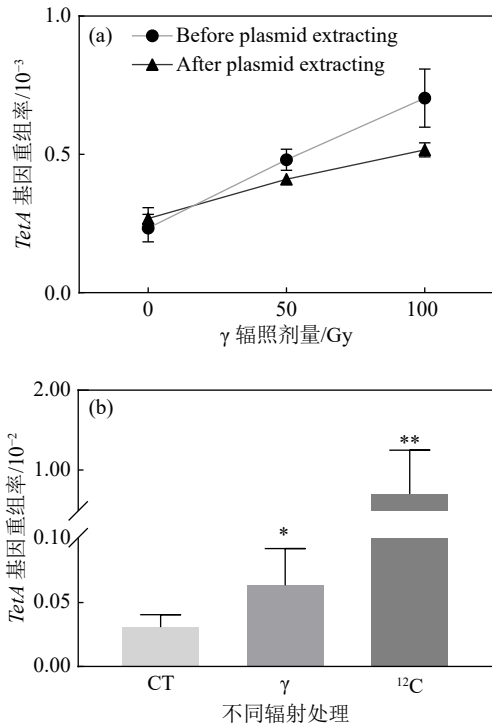


图 3 不同辐射剂量以及辐射类型对四环素同源重组频率的影响

(a)  $\gamma$  辐照后提质粒转化对四环素重组率的影响；(b) 不同辐射类型辐照 100 Gy 处理后 *TetA* 同源重组率的比较。\*\* $P < 0.01$ ，\* $P < 0.05$ 。

通过对  $\gamma$  与重离子辐照 100 Gy 后的 *TetA* 重组率比较发现，重离子辐射诱导 *TetA* 基因的同源重组频率远高于  $\gamma$  辐射，相较于对照组以及  $\gamma$  辐照 100 Gy 组，重离子辐照 100 Gy 后诱导的 *TetA* 同源重组频率呈现量级的增加 [图 3(b)]，表明重离子辐射诱导更多的 DSB 产生。

### 2.4 辐射类型对单独 *LacI* 基因突变频率的影响

为了进一步对重离子辐射诱导团簇型 DNA 损伤进行分析，在 *TetA* 同源重组对 DSB 损伤位点进行定位以后，对其侧翼连接的反向突变筛选基因 *LacI* 进行序列分析，理论上如果损伤是离散的，则难以在 DSB 损伤位点检测到其侧翼序列的突变。*LacI* 突变会抑制阻遏物的产生，通过营养缺陷型培养基 P-Gal 以及蓝白斑筛选的方法可以筛选到反向筛选基因 *LacI* 突变的质粒。首先我们检测了 *LacI* 基因单独响应辐射的情况， $\gamma$  辐照后，*LacI* 基因的突变频率随着辐照剂量的增加而增加，并在 100 Gy 时呈现显著差异 [图 4(a)]。通过对比 100 Gy  $\gamma$  与重离子辐照后的 *LacI* 基因突变情况，结果显示，重离子辐射诱导反向筛选基因 *LacI* 突变的频率是  $\gamma$  辐照的 5.2 倍，是对照组的 18.5 倍，均呈现出极显著差异 [图 4(b)]。表明反向筛选基因 *LacI* 能够很好地响应辐射，且重离子辐照诱导更高频率的突变产生。

### 2.5 辐射类型对四环素同源重组及反向突变筛选基因的影响及突变谱分析

前期实验分别验证了四环素 *TetA* 基因辐照后发生同源重组的重组率，以及反向突变筛选基因 *LacI* 辐照后产生突变的突变率。接下来对  $\gamma$  辐照和重离子辐照后同时发生四环素 *TetA* 基因同源重组和反向突变筛选基因产生突变的情况进行分析。结果发现，重离子辐射诱导产生 *TetA* 基因重组且 *LacI* 基因突变的频率远高于对照组以及  $\gamma$  辐照组，且重离子辐射诱导 *TetA* 基因以及 *LacI* 基因双突变产生是对照组的 16 倍，是  $\gamma$  辐照组的

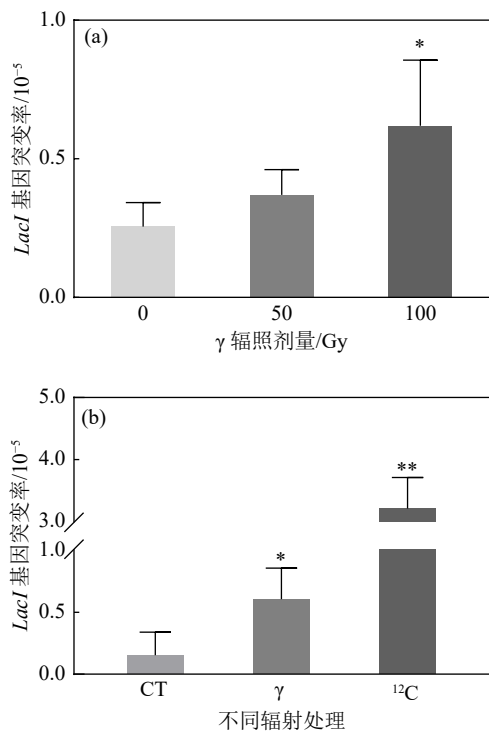


图 4 不同辐射剂量及辐射品质对  $LacI$  基因突变的影响  
(a) 不同剂量  $\gamma$  辐照后  $LacI$  基因突变率; (b) 不同辐射类型辐照 100 Gy 处理对  $LacI$  基因突变率的影响; \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ 。

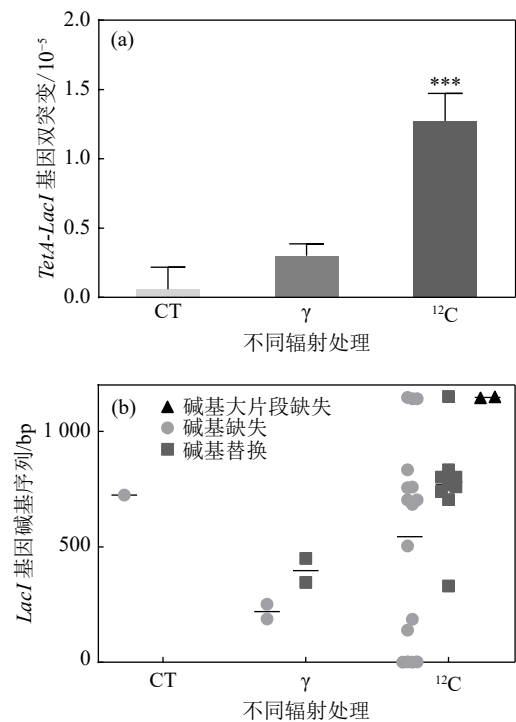


图 5 辐射品质对基于四环素同源重组的反向筛选体系的可行性的验证

(a) 不同辐射处理诱导同源重组双靶点体系突变率; (b)  $LacI$  基因序列上突变点定位及突变类型; \*\*\* $P < 0.001$ 。

4 倍, 表明重离子辐射更高效地诱导团簇型损伤突变产生。

将上述双筛突变的单克隆菌落进行  $LacI$  基因碱基序列测序, 根据结果进一步分析重组报告基因侧翼序列的突变谱, 如图 5 所示, 重离子辐射诱导  $LacI$  基因产生的突变类型中, 碱基缺失型突变比例较高, 其次是碱基替换。在筛选到的突变体中, 碱基缺失主要以 A- 为主, 占碱基缺失突变的 50%, 而碱基替换中又以 C-T 之间的替换为主。并且相较于  $\gamma$  射线诱导产生的  $LacI$  基因突变, 重离子辐射产生的突变位点较为集中。  $LacI$  基因序列长 1 160 bp (包含启动子), 筛选到的双突变克隆中,  $TetA$  基因发生同源重组的情况下侧翼序列  $LacI$  基因突变位点多集中在基因序列的 650 bp 之后, 碱基缺失中的 A- 突变多集中在 703 bp, 而 G- 则集中在  $LacI$  基因的末端序列, 从  $LacI$  基因全序列分析, 碱基缺失中 A-, G- 热点位点周围多为连续的几个 A 碱基, 推测与 A-T 之间的两个氢键相较于 G-C 之间的三个氢键更易断裂有关。相较于对照组以及  $\gamma$  辐照组产生的  $LacI$  基因全部为单碱基突变, 重离子辐射存在大片段缺失, 并且位于  $LacI$  基因序列的中下游位置。以上结果表明, 基于同源重组的反向突变基因筛选体系对于重离子辐射 DNA 损伤位点标记及突变分析实验方法是可行的。

### 3 讨论

重离子辐射的诱变机制一直是辐射生物学领域关注的焦点。重离子辐射具有很高的线传能密度和较宽的径向能量分布 (Radial energy distribution), 因此在击中 DNA 的靶点区域会产生团簇状的损伤。由于团簇损伤的构成比较多样, 也就导致了团簇损伤修复具有更高的复杂性以及更高的致突变能力。研究重离子诱变机制的一个关键是在基因组序列水平确定重离子的辐射靶点。日本研究人员 Hase 等 [16] 和 Kazama 等 [17] 构建了叶毛调控基因突变体系和黄色荧光蛋白 (YFP) 植物体系对重离子辐射靶点进行定位, 但是这两个体系存在一定的不足之处: 一是实验过程繁琐, 例如叶毛调控基因突变体系需要预先构建  $glp-1$  基因的杂合植株, YFP 体系需要进行大量的后代筛选; 二是体系使用的报告基因都是隐性突变, 可以由多种损伤类型诱导, 对重离子靶点序列的定位是非特异性的。基于 HR 修复对 DSB 特异性响应的特性, 并且正向同源重复序列发生同源重组时是同源片段缺失型修复, 在本研究中构建了  $TetA$  同源重组元件, 同源序列任何位点发生 DSB 都可以导致重组的发生, 具有很高的诱变效率, 重组后的序列可以利用 PCR 片段长度进行区分 [18]。因为重离子辐射诱导的团簇损伤的中心区域富集 DSBs, 因此同源重组报告基

因主要用于重离子辐射靶点的序列定位。双突变筛选报告系是研究突变热点的重要方法,并在大肠杆菌、酵母等体系中得到应用,例如在酵母中,利用甲基甲磺酸盐诱导 *CAN1* 基因损伤,通过在 *CAN1* 基因两侧插入两个突变报告基因,确定 DNA 损伤诱发的突变范围以及检测多重突变发生的频率<sup>[19-21]</sup>。重离子诱发的 DNA 团簇损伤通常会导致聚集性的突变,这也是重离子辐射诱发突变的另一个重要特征<sup>[22]</sup>。基于此,本研究在重组报告基因的侧翼链接了 *LacI* 报告基因,进一步提高聚集性突变的检测效率。

在本研究中,低 LET  $\gamma$  辐射处理显示 *TetA* 报告基因的同源重组率会随着辐照剂量的增加而上升,辐照剂量为 100 Gy 时产生显著性差异。而高 LET 重离子辐照产生的同源重组频率相较于  $\gamma$  辐照有一个量级的增加,说明重离子辐照过程中产生更丰富的 DSBs。对比重离子辐照与  $\gamma$  辐照下侧翼 *LacI* 报告基因的突变频率,结果显示,重离子辐照下 *LacI* 基因的突变频率相较于  $\gamma$  辐照同样也有一个量级的增加,显示重离子诱导的团簇损伤的周围也含有更多非 DSB 类型的损伤(也不能排除这种突变是 DSBs 修复所致)。在对实验体系进行双筛的情况下,即 *TetA* 基因同源重组和 *LacI* 基因突变同时发生,重离子辐照的结果也是远高于  $\gamma$  辐照,双突变在重离子辐射诱导下出现的频率相较于  $\gamma$  辐射有数倍的提升,而相较于对照组更是有量级的增加,这说明重离子辐射更倾向诱导 DNA 团簇型损伤。以上结果表明,基于同源重组的反向筛选体系能有效地对重离子辐射的靶点进行序列定位,并进一步分析 DNA 团簇损伤产生的突变模式。值得注意的是,  $\gamma$  辐射也能诱导双突变的产生(尽管频率较低),说明该实验体系对重离子辐射的检测并不是完全特异性的,后期还需要结合 *LacI* 的突变的特征和模式做进一步的判断。另外,由于重离子辐射实验机时为一年两次,本研究在重离子辐射方面的数据还不够丰富,后期需要进一步结合重离子以及其它高 LET 辐射如质子等的物理特性来研究团簇损伤对径迹结构的依赖关系,以及通过构建不同间距的报告基因的实验体系来进一步研究团簇损伤导致突变的空间模式。

总而言之,本研究提出了一种重离子辐射靶点定位

和突变分析的研究思路,并基于大肠杆菌构建了相应的实验品系,通过  $\gamma$  辐射和重离子辐射处理实验,我们证明了该研究思路的可行性,实验体系的建立也为进一步深入研究重离子辐射诱变的相关机制提供了方法学基础。

#### 参考文献:

- [1] JIN Yuanchang, LI Jingwen, LI Jieyun, et al. *Front Oncol*, 2021, 11: 634913.
- [2] NICKOLOFF J, SHARMA N, TAYLOR L. *Genes (Basel)*, 2020, 11(1): 99.
- [3] IFIGENEIA V, ZACHARENIA N, ALEXANDROS G, et al. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1789.
- [4] RYUICHI O. *International Journal of Cancer*, 2012, 130(5): 991.
- [5] JULIE A, NIDHI B, CRISTINA M, et al. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(2): 260.
- [6] LI Yanqiu, KARDELL M B, WANG Feifei, et al. *DNA Repair (Amst)*, 2021, 108: 103244.
- [7] STEINERT J, SCHIML S, PUCHTA H. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(7): 1429.
- [8] ALEJANDRA B. *PLoS One*, 2021, 16(4): e0237413.
- [9] BOYKO A, ZEMP F, FILKOWSKI J, et al. *Plant Physiol*, 2006, 141: 488.
- [10] BOYKO A, KOVALCHUK I. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 260.
- [11] KOVALCHUK I, KOVALCHUK O, ARKHIPOV A. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 1054.
- [12] KOVALCHUK O, KOVALCHUK I, TITOV V. *Mutat Res*, 1999, 446: 49.
- [13] KOVALCHUK I, KOVALCHUK O, HOHN B. *Trends in Plant Sci*, 2001, 6: 306.
- [14] VIKASH K, CORENTIN C. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 642737.
- [15] JOSEPH S, RUSSELL D. *CSH Protoc*, 2006, 2006(1): 3944.
- [16] HASE Y, YOSHIHARA R, NOZAWA S, et al. *Mutat Res*, 2012, 731: 41.
- [17] KAZAMA Y, SAITO H, FUJIWARA M, et al. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71: 2864.
- [18] WRIGHT W, SHAH S, HEYER W. *J Biol Chem*, 2018, 293(27): 10524.
- [19] YANG Y, GORDENIN D, RESNICK M. *DNA Repair*, 2010, 9(8): 914.
- [20] MOORE J M, CORREA R, ROSENBERG S M, et al. *PLoS Genet*, 2017, 13(7): e1006733.
- [21] YANG Y, STERLING J, STORICI F, et al. *PLoS Genet*, 2008, 4(11): e1000264.
- [22] ASAITHAMBY A, CHEN D. *Mutat Res*, 2011, 711(1-2): 87.



# Construction and Validation of Experimental System for Heavy ion Radiation Targeted Loci Localization and *lacI* Mutation Analysis Based on Escherichia Coli

JIN Ming<sup>1,2</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, LIU Binmei<sup>1</sup>, BIAN Po<sup>1,†</sup>

(1. Institute of Intelligent Machines, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2. University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

**Abstract:** Heavy ion irradiation has unique physical and biological characteristics and has been widely applied in crop and bacteria mutation breeding. However, the mechanism underlying heavy ion irradiation mutagenesis is not completely clear. Unlike the conventional X and  $\gamma$  ray, heavy ion irradiation has a high linear energy transfer(LET) and mainly induces clustered DNA damage, the evolution of which to genetic variation is more complex and mutation types are more difficult to predict. Due to the limitation of experimental techniques, it is difficult to localize the DNA target of heavy ions at the level of DNA sequence. To address this issue, we first constructed a homologous recombination(HR) element of tetracycline resistance gene (*TetA*) in light of high abundance of DNA double strand breaks(DSB) in the core of heavy ion radiation-induced cluster damage. And the DSB specific response of HR. We then linked a reverse mutation screening gene *lacI* to the *TetA* recombination elements to detect cluster damage-derived mutations. Finally, this plasmid was transformed into E.coli. Based on this experimental system we comparatively analyzed *TetA* recombinations and mutations of *LacI* gene after irradiation with  $\gamma$ -ray and carbon heavy ions (80 MeV/u). We preliminarily verified the feasibility of this research strategy and provided a methodological foundation for further investigation of the mechanisms underlying heavy ion radiation mutagenesis.

**Key words:** heavy ions;  $\gamma$ -ray; homologous recombination; clustered damage

---

Received date: 18 Mar. 2022; Revised date: 21 Apr. 2022

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(12135016)

† Corresponding author: BIAN Po, [bianpo@ahmu.edu.cn](mailto:bianpo@ahmu.edu.cn)