

## Plasmid DNA damage by neutron and $\gamma$ - ray in the presence of BSH

Ki-Jung Chun · Won Sook Seo\*

Korea Atomic Energy Research Institute,  
\*Korea Research Institute of Standards and Science

### BSH 존재시 중성자 및 $\gamma$ - ray 조사에 따른 plasmid DNA의 손상

천기정 · 서원숙\*

한국원자력연구소, \*한국표준과학연구원

(2006년 1월 26일 접수, 2006년 4월 13일 채택)

**Abstract** - In this study, the extent of plasmid DNA damage was observed according to concentration of BSH(Boron Sulfhydryl Hydride) and irradiation doses of neutron and  $\gamma$ -ray. The plasmid used was both pBR 322 (2870 bp) and  $\phi$ X174 RF(5386 bp) DNA. Plasmid DNA damage by irradiation in the presence of BSH was analyzed by agarose gel electrophoresis. In the neutron experiment, DNA damage of both plasmid DNAs was increased according to increasing the concentration of BSH and neutron doses. But in the  $\gamma$ - ray experiment, there appeared no dose dependency as compared to the neutron experiment. The extent of the plasmid DNA damage in the presence of BSH was somewhat different according to irradiation by neutron or  $\gamma$ - ray.

**Key words** : Plasmid DNA, BSH, electrophoresis, neutron,  $\gamma$ -ray

**요약** - 본 연구에서는 boron 화합물인 BSH(Boron Sulfhydryl Hydride)의 농도와 중성자 및 감마선 방사선 조사선량에 따른 plasmid DNA의 손상 정도를 관찰하였다. Plasmid는 pBR 322(2870 bp)와  $\phi$ X174 RF DNA(5386 bp)를 사용하였고 조사 후 DNA의 손상 정도는 agarose gel 전기영동 상에서 관찰하였다. 중성자 조사에서는 plasmid DNA의 손상 정도는 BSH의 농도 및 조사 선량이 증가함에 따라 증가하였으나 감마선 조사에서는 조사하지 않은 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다. Plasmid DNA의 손상 양상은 BSH 존재시 중성자 및 감마선 조사에서 다소 차이를 알 수 있었다.

**중심어** : Plasmid DNA, BSH, 전기영동, 중성자, 감마선

### 서 론

Plasmid DNA는 세균 내에 존재하는 환상의 double-stranded DNA (dsDNA)로서, 모든 plasmid는 복제 개시점(origin of replication)이 될 수 있는 적어도 한 개의 DNA 염기서열을 갖고 있어 세포 내에서 세균의 염색체와 독립적으로 존재하고[1], 많은 plasmid들은 항생물질, 중금속 또는 UV 방사에 대한 방어와 같은 특이한 물

질대사 기능을 암호화한다[2,3]. 일반적으로 plasmid는 DNA의 이중 사슬이 supercoil 형태로 존재하는데 이 supercoil은 DNA 복제 및 유전자 발현을 포함한 대부분의 생물학적 과정의 조절에 중요하다[4]. 제한효소 및 활성산소물질(reactive oxygen species)에 의한 radical process, ionizing radiation, laser photolysis등에 의해 한 사슬에 틈(nick)이 생겨 절단이 발생하면 plasmid가 이완된 형태로 변환한다[5]. 이를 단일 사슬절단

(single-strand break, SSB)이라 부르고 같은 염기 짝에서 이중사슬이 모두 절단되어 선형으로 변환하는 경우를 이중 사슬절단(double-strand break, DSB)이라 부른다[6-10]. 전리방사선(ionizing radiation) 조사에 따른 DNA 손상은 세포 비활성화의 주요 원인의 하나로 여겨진다[11]. 전리 방사선에 의한 DNA 손상을 분석하는 방법들에는 전기영동법, pulsed-field 전기영동법, neutral filter elution (NFE)법, neutral sedimentation 및 electron microscopy를 포함한 많은 방법들이 있다[12-14].

본 실험에서는 현재 연구 수행중인 붕소 중성자 포획 치료법(Boron Neutron Capture Therapy, BNCT)의 생물학적인 기초 자료 확보를 위해 plasmid DNA인 pBR 322와  $\phi$ X174 RF를 이용하여 보론화합물인 BSH 첨가 후 각각 중성자와  $\gamma$ -ray를 조사한 다음 plasmid DNA의 손상여부를 전기영동상에서 확인 및 비교 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Plasmid DNA 준비

실험에 사용한 plasmid DNA는 상용화된 pBR 322와  $\phi$ X174 RF DNA를 사용하였다. pBR 322(2870 bp) DNA는 *E. coli* plasmid이고, 환상의 double-stranded DNA다.  $\phi$ X174RF DNA(5386 bp)는 환상의 double-stranded DNA(supercoiled)며 분자량은  $3.50 \times 10^6$  dalton이다.

### 2. 보론화합물 첨가

보론화합물은 BSH(Boron Sulfhydryl Hydride)를 사용하였으며 중성자 조사시는 75 및 150 ppm의 농도를 사용하였으며  $\gamma$ -ray 조사시에는 37.5, 75 및 150 ppm의 농도를 사용하였다.

### 3. 방사선 조사

#### 1) 중성자

Plasmid DNA에 각각의 농도의 BSH를 첨가하고, 한 시간 후에 중성자를 조사하였다. 중성자는 하나로 원자로 내의 BNCT 시설 (Neutron flux:  $1.036739 \times 10^9$ )에서 10, 30 및 60 Gy를 조사하였다.

#### 2) $\gamma$ - radiation

Plasmid DNA에 각각의 농도의 BSH를 첨가한 후  $\gamma$ -ray는 원자력 연구소 소재 저준위 조사시

설의  $^{60}\text{Co}$  감마선원(선원강도 150TBq, Panoramic Irradiator, AECL)을 이용하여 7.5, 15 및 30 Gy를 조사하였다.

### 4. 전기영동 분석 및 확인

중성자와  $\gamma$ -ray 조사 후 결과물 확인을 위해 각각의 plasmid DNA를 전기영동하여 확인하였다. 조사한 plasmid DNA 산물에 dye solution을 적정량 첨가하여 ethidium bromide를 첨가한 1% agarose gel에 loading하여 TAE buffer(pH 8.0)에서 50 voltages에서 45분 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 plasmid DNA의 손상 여부를 UV로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 보론화합물 BSH를 첨가 후 중성자 및  $\gamma$ -ray를 조사하였을 때 DNA에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 상용화된 plasmid pBR 322(2870 bp)와  $\phi$ X174 RF DNA(5386 bp)를 이용하여 보론화합물인 BSH 첨가 후 중성자(flux:  $1.036739 \times 10^9$ )를 조사한 결과(Fig 1, 2), BSH의 농도가 높을수록 DNA 손상도 증가되었으며 중성자 조사선량 증가시에도 DNA 손상이 증가함을 뚜렷하게 관찰하였다.



Fig. 1. Agarose-gel electrophoresis of plasmid DNA irradiated with neutron. The C-4 is pBR 322 DNA : C, control; 1, 10 Gy(75 ppm of BSH); 2, 30 Gy(75 ppm); 3, 30 Gy(150 ppm); 4, 60 Gy(150 ppm).

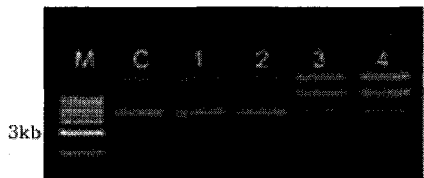


Fig. 2. Agarose-gel electrophoresis of plasmid DNA irradiated with neutron. The C-4 is  $\phi$ X174 RF DNA : C, control; 1, 10 Gy(75 ppm of BSH); 2, 30 Gy(75 ppm); 3, 30 Gy(150 ppm); 4, 60 Gy(150 ppm).

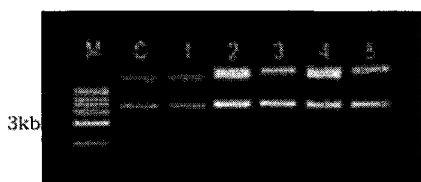


Fig. 3. Agarose-gel electrophoresis of plasmid DNA irradiated with  $\gamma$ - radiation. The C-5 is pBR 322 DNA : C, control; 1, 7.5 Gy(37.5 ppm of BSH); 2, 7.5 Gy(75 ppm); 3, 15 Gy(150 ppm); 4, 30 Gy(75 ppm); 5, 30 Gy(150 ppm).

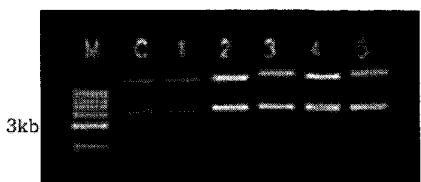


Fig. 4. Agarose-gel electrophoresis of plasmid DNA irradiated with  $\gamma$ - radiation. The C-5 is  $\phi$ X174 RF DNA: C, control; 1, 7.5 Gy(37.5 ppm of BSH); 2, 7.5 Gy(75 ppm); 3, 15 Gy(150 ppm); 4, 30 Gy(75 ppm); 5, 30 Gy(150 ppm).

위와 같은 방법으로  $\gamma$ - ray(Fig 3,4)를 조사하였을 때 중성자 조사시와는 달리 BSH의 첨가량과 조사선량이 증가해도 두 plasmid는 대조군과 많은 차이를 보이지 않았다. 그러나 pBR 322 및  $\phi$ X174 RF DNA에 조사선량을 높이고 BSH의 첨가량을 증가 시킬수록 open circular 형태와 linear 형태가 조금씩 나타났다.

Kumar SS[15]등에 의하면 pBR 322 plasmid DNA에 0~8 Gy의  $\gamma$ - ray를 조사한 후 DNA 손상정도를 관찰한 결과, 0~6 Gy 조사시 DNA 손상정도가 선량에 따라 증가하였으며 8 Gy 조사시에는 손상정도가 감소한다고 하였다. 또한 Murakami M[16]등의 연구에서 plasmid DNA에 1.9, 5.6 및 8.3 kGy의  $\gamma$ -ray를 조사하여 DNA (closed circular, linear and open circular form)를 agarose gel 전기영동상에서 확인한 결과,  $\gamma$ -ray를 조사하지 않은 대부분의 DNA는 closed circular 형태를 나타내었으나 조사선량의 증가에 따라 이 형태의 DNA는 감소되었다고 하였다. 대부분의 DNA 손상은 단일 사슬절단 (open circular) 형태를 나타내었고 각각의 선량을 조사한 모든 시료에서 나타났다고 하였다. Closed circular 형태는 5.6 kGy 이상의 선량을 조사한 시료에서는 관찰이 불가능할 정도로 감소하였으나, 1.9 kGy를 조사한 시료에서는 관찰되었다고

하였다. 이 결과에서,  $\gamma$ -ray가 조사된 모든 DNA 분자들은 DNA single-strand break, DNA double-strand break 또는 DNA base break와 같은 DNA 손상 형태를 초래한다는 것을 알 수 있다고 하였다. Linear 형태의 DNA는 조사선량의 증가에 따른 DNA 이중 사슬절단에 의해 형성된다고 하였다. 보론화합물의 존재여부에 따른 DNA의 손상정도는 방사선의 종류에 따라 다른 결과를 나타내고 있다. 두 plasmid DNA에 75 ppm의 BSH를 첨가한 후 10 및 30 Gy의 중성자를 조사한 결과, DNA의 손상이 뚜렷이 나타나지 않았으나 150 ppm의 BSH를 첨가한 후 30 및 60 Gy의 중성자 조사시 DNA의 손상이 뚜렷하게 관찰되었다. 본 실험에서 붕소화합물인 BSH가 중성자를 포획하여 알파선을 방사하고[17], 방사된 알파선이 DNA를 손상시켜 plasmid의 형태를 변형시켜 open circular 형태와 linear 형태로 나타남을 *in vitro*상에서 직접 확인하였다. 또한  $\gamma$ -ray 조사시 DNA 손상정도를 관찰한 결과, 37.5 ppm의 BSH를 첨가한 후 7.5 Gy를 조사시 두 plasmid 모두 DNA 손상을 관찰 할 수 없었으나 75 ppm이상의 BSH를 첨가하고 조사선량을 증가시킨 결과, DNA의 open circular 형태와 linear 형태가 조금씩 나타났다. 하지만 중성자 조사시와는 달리 뚜렷한 DNA 손상 정도를 확인할 수 없어 BSH가  $\gamma$ - ray에 의해 DNA 손상에 크게 작용하지 않는 것으로 보여진다.

## 결 론

하나로를 이용한 붕소 중성자 포획 치료법(BNCT)을 위한 생물학적 자료 확보를 위해 사용되는 plasmid를 이용하여 *in vitro*상에서 DNA 손상실험을 수행하였다. 보론화합물인 BSH를 pBR 322와  $\phi$ X174 RF plasmid DNA에 첨가한 후 중성자와  $\gamma$ - ray를 각각 조사하고 DNA 손상 정도를 서로 비교 분석한 결과, 중성자 조사시에는 보론화합물의 농도가 높을수록, 조사선량이 증가할수록 DNA 손상 정도가 증가하였다. 그러나  $\gamma$ -ray를 조사한 경우에는 중성자 조사시와는 다른 결과를 나타내었다. BSH 농도 및  $\gamma$ - ray 선량이 증가 할수록 DNA 손상의 증가를 관찰할 수 없었다. 이는 보론화합물이 중성자 포획물질로써 작용하여 중성자의 세포 파괴를 증폭시킨다는 것을 나타내고, 보론 화합물 존재의 여부가  $\gamma$ - ray 조사시 DNA 손상에 크게 영향을 미치지 않는다는

것을 알 수 있다. 본 실험으로 보론화합물의 존재 여부와 방사선 종류에 따른 DNA 손상 정도의 차이를 확인할 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 과학기술부에서 지원한 원자력 중장기 과제 연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

#### 참고문헌

- Hasegawa K and Yoshioka H. DNA damage by various radiations. *Radiat. Phys. Chem.* 1997;49:81-84.
- Nevins SA, Siles BA and Nackerdien ZE. Analysis of gamma radiation-induced damage to plasmid DNA using dynamic size-sieving capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 2000;741:243-255.
- Siles BA, Nackerdien ZE and Collier GB. Analysis of DNA fragmentation using a dynamic size-sieving polymer solution in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1997;771: 319-329.
- Sinden RS. In: DNA structure and function. Academic press. San Diego. CA. 1994: Chapter 3.
- Siles BA and Nackerdien ZE. Analysis of gamma radiation-induced damage to plasmid DNA using dynamic size-sieving capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2000;741:243-255.
- Folkard M, Prise KM, Vojnovic B, Davies S, Roper MJ and Michael BD. Measurement of DNA damage by electrons with energies between 25 and 4000 eV. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993;64:651-658.
- Hieda K, Hirono T, Azami A, Suzuki M, Furusawa Y, Maezawa H, Usami N, Yokoya A and Jobayashi K. Single- and double-strand breaks in pBR322 plasmid DNA by monochromatic X-rays on and off the K-absorption peak of phosphorus. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996;70:437-445.
- LaMarr WA, Sandman KM, Reeve JN and Dedon PC. Differential effects of DNA supercoiling on radical-mediated DNA strand breaks. *Chem. Res. Toxicol.* 1997;10: 1118-1122.
- Menke H, Kohnlein W, Joksch S and Halpern A. Strand breaks in plasmid DNA, natural and brominated, by low-energy X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991;59:85-96.
- Jun SM, Kim YM, Kim DW, Youn HS, Chiba S and Kimura A. The effects on Escherichia coli and plasmid DNA using ultrasoft X-ray. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 2000;15(1):84-87.
- Chadwick KH and Leenhouts HP. On the linearity of the dose-effect relationship of DNA double strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* 1994;66:594-552.
- Roots R, Karft G and Grosschalk E. The formation of radiation-induced DNA breaks: the ratio of double-strand breaks to single-strand breaks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physics.* 1985;11:259-265.
- Stamato TD and Denko N. Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* 1990;121:196-205.
- Bradley MO and Kohn KW. X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:793-804.
- Kumar SS, Chaubey RC, Devasagayam TPA, Priyadarsini KI and Chauhan PS. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR 322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutation Research.* 1999;425:71-79.
- Murakami M, Hirokawa H and Hayata I. Analysis of radiation damage of DNA by atomic force microscopy in comparison with agarose gel electrophoresis studies. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2000;44:31-40.
- Coderre JA and Morris GM. The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.* 1999;151:1-18.