



电离辐射生物标志物 γ -H2AX 的检测 技术研究进展*

刘 樱 熊忠华 夏斌元 陈 珊**

(中国工程物理研究院材料研究所, 绵阳 621907)

摘要 电离辐射可导致DNA双链断裂,从而使组蛋白H2AX迅速在双链断裂处磷酸化为 γ -H2AX。检测细胞中 γ -H2AX聚集形成的焦点数目可用于评价DNA双链断裂情况,且与辐射剂量相关。因此, γ -H2AX可作为电离辐射的生物标志物,用来评价电离辐射的致突变能力,亦可作为电离辐射生物剂量计,用于估算个体受照剂量。 γ -H2AX检测技术在辐射生物学研究、辐射分子流行病学调查,以及辐射事故应急响应与医学处置等方面具有重要应用价值。本文将重点阐述近十年来国内外基于电离辐射生物标志物 γ -H2AX的检测方法研究进展和应用前景。

关键词 电离辐射, γ -H2AX, 生物标志物, 生物剂量计

中图分类号 Q691.5, R394.7

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0379

在真核生物中,脱氧核糖核酸(DNA)与组蛋白结合形成核小体,构成染色质的功能单位,而DNA双链断裂(DNA double strand break, DSB)是电离辐射引起DNA损伤的主要形式。当DNA双链发生断裂时,在断裂位点将出现组蛋白H2AX在39位丝氨酸(γ -H2AX)的磷酸化。磷酸化的 γ -H2AX在DSB位点累积,同时募集多种参与DNA损伤修复的分子,形成修复灶,共同参与早期DNA损伤修复。利用抗磷酸化 γ -H2AX的抗体检测,可建立电离辐射与磷酸化 γ -H2AX焦点之间的关系^[1-2]。1998年,Rogakou等^[3]首次发现并报道了 γ -H2AX可作为细胞DNA双链断裂的快速又敏感的信号分子,随后的大量研究发现, γ -H2AX焦点数量在电离辐射发生大约30 min后达到峰值,在24 h内迅速下降并在几天内下降到基线水平,具体时间取决于相应的辐射剂量,焦点数量也与辐射剂量相关^[4-5]。采用 γ -H2AX焦点法进行剂量估算需在放射后1~2 d内进行,这也使其成为目前时效性最高的辐射生物标志物之一。因此,近年来, γ -H2AX检测技术在快速辐射剂量估算、辐射应急分诊等方面的应用价值被国内外广泛重视,尤其在精准化、小型化、高通量化等方面开展了诸多研究工作。

1 γ -H2AX常用检测技术

目前, γ -H2AX的检测方法主要包括免疫荧光法(荧光显微镜和流式细胞术)、酶联免疫吸附定法和免疫印迹法等,以上方法均基于免疫细胞化学技术,其原理为用标记的抗磷酸化 γ -H2AX的抗体对目标细胞的磷酸化 γ -H2AX进行定性、定位或定量检测。

1.1 免疫荧光法

免疫荧光法主要利用 γ -H2AX单克隆抗体作为一抗,与细胞内DSB位点处的 γ -H2AX特异性结合,再加入标记有荧光素的二抗,与一抗形成夹心结构,利用荧光显微镜或流式细胞术采集荧光信号,即可分析目标细胞内 γ -H2AX含量(图1)。荧光显微镜观察是最直观且最便捷的检测技术,既可以对细胞内 γ -H2AX焦点计数,又可定性获得其荧光强度大小,从而比较不同剂量下细胞内的 γ -H2AX含量,但该方法存在主观误差,使得其准

* 国家自然科学基金(11705170)和中国工程物理研究院材料研究所基金(TP02201709, TCSQ2016310)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0816-3620126, E-mail: qingmoheng@qq.com

收稿日期: 2021-12-07, 接受日期: 2022-03-15

准确度不高，目前已开发有多种图像分析软件对获得的荧光图像进行分析，可减少人为误差并节约时

间，提高准确性。而流式细胞术可实现大批量样本中 γ -H2AX的测定。

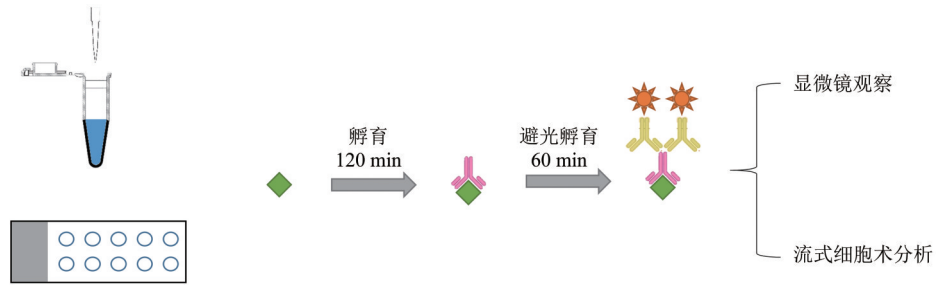


Fig. 1 Schematic diagram of immunofluorescence assay for γ -H2AX detection

图1 免疫荧光法检测 γ -H2AX步骤示意图

1.2 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 是酶免疫测定技术中应用最广的技术。用于检测 γ -H2AX的主要原理是以 γ -H2AX的单克隆抗体作为 γ -H2AX捕获抗体，组装在固相载体 (如聚苯乙烯微量反应板) 上，当含 γ -H2AX的标本被捕获后，加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的检测抗体，

形成夹心结构。再加入酶标底物 (即 TMB 溶液) 和终止液即可通过在 450 nm 波长处测吸光度 (A) 值获得标本中 γ -H2AX的含量 (图2)。无论在定量分析精确度上，还是标本处理流程上，ELISA 都较荧光显微镜和流式细胞术更具优势，且可采用酶标仪和 96 孔板进行高通量测定，因此，近年来也被广泛用于 γ -H2AX的测定。

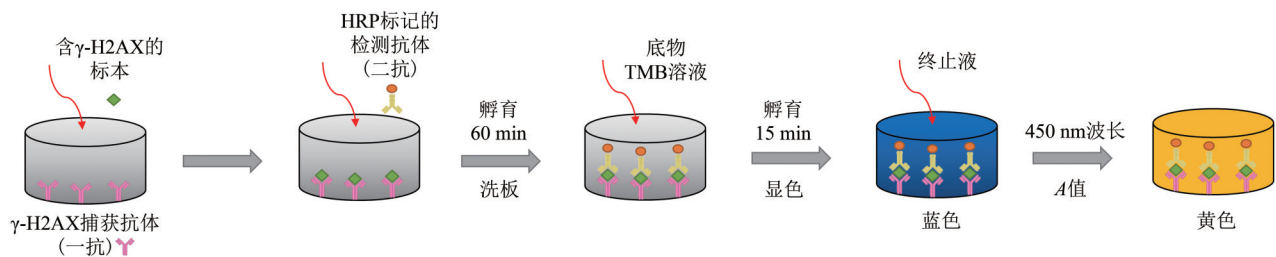


Fig. 2 Schematic diagram of enzyme linked immunosorbent assay for γ -H2AX detection

图2 酶联免疫吸附法检测 γ -H2AX步骤示意图

1.3 蛋白质免疫印迹法

蛋白质免疫印迹是将电泳分离后的细胞或组织总蛋白质从凝胶转移至固相支持硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane, NC膜) 或聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene, PVDF) 上形成印迹膜，印迹膜

上的目标蛋白可以被特异性抗体识别并捕获。同时，利用酶或同位素标记的二抗作为信标，经过底物显色或放射自显影可对被捕获的目标蛋白进行信号示踪 (图3)。

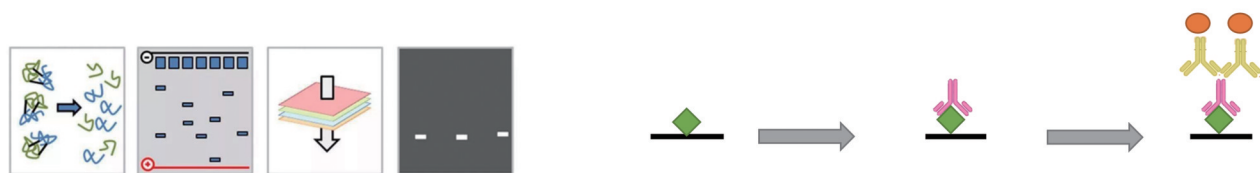


Fig. 3 Schematic diagram of Western blot for γ -H2AX detection

图3 免疫印迹法检测 γ -H2AX步骤示意图

2 γ -H2AX检测技术进展

γ -H2AX 的检测结果可反映出 DSB 损伤修复情况, 其具有检测周期短、特异性与灵敏度较高的优点, 可满足辐射剂量估算和辐射应急分诊的应用需求。目前, 改进 γ -H2AX 检测技术, 主要涉及减少采样量和检测时间、借助新型显微镜技术、传统技术改进、检测自动化以及其他增强检测效果的方法等, 目的均为尽可能在更短时间、更少样品量和更高通量的情况下获得更清晰的检测结果。

2.1 样品量

辐射事故后, 为尽早对受照人群进行初步剂量估计和早期分诊, 需要在同一时间内对尽可能多的样本进行快速评估, 因此检测时所需的样品量及其处理时间十分关键。常规检测方法需要从装有若干毫升体积血液样品的肝素管中, 通过 Ficoll 密度梯度离心法获得足够多的淋巴细胞, 再进行随后的洗涤、分离和固定步骤。Sowa 等^[6] 比较了经静脉穿刺和 Ficoll 密度梯度离心获得的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 和指尖毛细血管血中分离的单个核细胞 (capillary blood mononuclear cells, CBMCs), 同时利用间接免疫荧光法分析 γ -H2AX 焦点情况, 发现 CBMCs 可替代 PBMCs 用于 DSB 分析。而 Wojewodzka 等^[7] 通过改变样品处理参数来评估其对 γ -H2AX 焦点的影响, 并优化出一种理论上可应用于指尖血的微量测定方案。Moquet 等^[8] 已开发出一种检测方法, 只需少于 0.1 ml 的血液样品, 在理论上也可以实现手指穿刺取样。该方法可将 96 个样品的处理时间从常规方法的 15 h 减少为约 4 h。但是需要牺牲细胞数和焦点清晰度。Heylmann 和 Kaina^[9] 则通过将指尖血注入肝素化的微量红细胞压积玻璃毛细管中, 然后将其涂抹于玻片上, 即可实现分析一滴血液中的 γ -H2AX 焦点来检测 DNA 损伤, 该方法简单、快速、廉价, 允许大量的血液采样和长期存储, 适用于人类和动物群体中遗传损伤的快速和大规模筛选。Johnston 等^[10] 开发了一种不需要对血液样品进行过滤、富集或纯化的全血免疫分析方法, 分析结果在 0~5 Gy 的剂量范围内呈线性关系, 理论上可以将这种分析从实验室扩展到野外。

2.2 超分辨显微镜技术

通过光学检测在单细胞水平上评估电离辐射暴露后的 DNA 损伤反应和修复动力学, 是 γ -H2AX 检测技术中常用的方法之一。近年来, 借助新型超

分辨显微镜技术, 可以在纳米尺度上研究电离辐射在单细胞中的分子效应^[11]。在生物标本中, 纳米标记的分子结构可以精确到 10 nm (可见光波长的 1/50), 这属于单个核小体、抗体、受体等的范围。而单分子定位显微镜 (single molecule localization microscopy, SMLM) 是目前最流行的超分辨技术之一。大多数单分子定位显微镜方法依赖于单个荧光团分子的随机光谱调制, 如光活化定位显微镜 (photo-activated localization microscopy, PALM)、荧光 PALM (fluorescence PALM, FPALM)、随机光学重建显微镜 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)、直接 STORM (direct STORM, dSTORM)、基态耗尽显微镜 (ground state depletion microscopy followed by individual molecule return, GSDIM) 等。最近的大多数研究主要集中在对暴露于不同剂量 γ 射线辐射并在辐射暴露后不同时间点固定的细胞中, γ -H2AX 特异性抗体进行 SMLM 研究^[12-16]。

2.3 图像分析软件

提高光学检测水平可以更深入地对 DNA 损伤机制进行基础科学研究, 但这些超分辨显微镜的使用会不同程度增加检测成本和时间, 并不适用于现场和快速检测。而对获得的荧光图像进行准确地自动图像分析则不仅可以缩短分析时间, 也可减少人为误差。使用图像处理和分析的自动 γ -H2AX 分析已被证明比人工分析的准确度和平行性高, 因为人工分析不能提供诸如核的大小或焦点的强度等额外信息^[17-18]。焦点的量化和表征理论上需要统计大量的细胞来确保结果的可信度, 因此这需要利用合适的图像分析软件, 例如包含有图像预处理和转换、有效信息的提取, 以便进行进一步的数据分析^[18]。目前, 已开发有多种基于显微镜图像的开源或闭源的自动分析软件, 包括 ImageJ^[19-20]、DeepFoci^[21]、CellProfiler^[22-24]、FociCounter^[25]、FoCo^[26]、FocAn^[27] 等, 均能对基于 γ -H2AX 的细胞图像进行分析。开源软件相较闭源软件, 因其具有可访问的源代码, 使得用户可根据特定的需求对参数进行修改; 分析过程透明可视化; 免费提供给科研工作者使用等优点, 成为许多科研工作中优先考虑使用的软件。表 1 比较了几种常用图像分析软件所具备的功能, ImageJ 和 CellProfiler 可提供多种插件, 进行批量处理, 同时可获得逐步分析的结果; DeepFoci 和 FocAn 可分析共聚焦显微镜获得的 3D 多通道数据, 从而分析三维立体结构下的焦点

分布情况；FociCounter 仅可获得焦点及焦点强度等简单数据，但软件分析操作较为直观简洁。基于图像分析软件获得的结果会因参数设置的不同而存

在明显差异，后续研究中需要建立统一的评判标准。

Table 1 Comparison of image analysis software functions

表1 图像分析软件功能比较

软件名称	功能				
	提供插件	批处理	逐步分析	补偿不均匀照明/清晰度	3D多通道数据
ImageJ	√	√	√	×	×
DeepFoci	×	√	√	√	√
CellProfiler	√	√	√	√	×
FociCounter	×	√	×	×	×
FoCo	√	√	√	×	×
FocAn	√	√	√	×	√

2.4 检测新技术

成像流式细胞术 (imaging flow cytometry, IFC) 将光学显微镜和流式细胞术的优势结合，使研究人员在快速分析大量细胞的同时，可根据细胞形态学结果辅证分析结果。Lee 等^[28] 开发出一种基于成像流式细胞术的快速、高通量 γ -H2AX 检测方法，用于评估电离辐射暴露后人外周血细胞 DNA 双链断裂修复动力学，结果分析与已有文献的理论曲线相符^[5]。基于成像流式细胞术建立的 γ -H2AX 检测方法可以提供一个高通量的实用平台，通过预测个体放射敏感性和与放疗相关的不良反应风险，促进精准医疗。

对于像磷酸化组蛋白 γ -H2AX 这类特定蛋白质的相对定量分析，酶联免疫吸附试验和免疫印迹法都需要先将细胞裂解后提取总蛋白质方可进行后续实验。细胞酶联免疫吸附法 (cell enzyme-linked immunosorbent assay, cell-ELISA) 和细胞内免疫印迹法 (in cell Western, ICW) 则无需裂解细胞，而是在细胞原位检测目标蛋白质，相较于传统方法，省略了前期细胞裂解物的制备、制胶、电泳以及转膜等费时又易出错的步骤，也极大减少了因裂解细胞获取总蛋白质时造成的损失，具有特异、灵敏及操作简便等特点。Matsuzaki 等^[29] 和 Tronnet 等^[30] 分别利用这两种方法对检测 γ -H2AX 进行了尝试，并建立了一套灵敏便捷的检测方法。

近年来，利用高效液相色谱串联质谱技术 (high liquid chroma-tography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 对 γ -H2AX 磷酸化位点进行定量检测，可实现细胞内 γ -H2AX 定量分析，

该方法于 2015 年由 Matsuda 等^[31] 建立，军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所谢剑伟研究员课题组^[32] 亦建立和评估了 γ -H2AX 质谱定量检测技术在细胞基因毒性方面的应用，并获得了 DNA 损伤及修复动力学曲线，在化合物的基因毒性测试中显示了可行性及优越性。

3 自动化/便携式设备研制

改进生物剂量估算方法的检测速度和效率，有助于在出现放射性事故时提高救援速率，保存有限医疗资源，遏制大规模的恐慌。因此需要研制出可快速自动甚至便携式的生物剂量估算系统，用以评估可能的大量个人辐射照射剂量。

现有的商品化的自动化免疫荧光分析及显微系统如 AKLIDES^[33]、Europattern^[34] 和 Nova View^[35] 等，均可在一定程度上实现 γ -H2AX 生物剂量测定部分自动化，从而缩短时间，提高效率。Garty 等^[36-39] 研制出一种基于机器人的自动生物剂量检测工具 (rapid automated biodosimetry tool, RABIT)，利用多种先进技术，实现了 γ -H2AX 生物剂量测定从样品分离到荧光成像全流程自动化。测试结果表明，RABiT 可在 18 h 工作周期内完成对 5 859 个生物样本的测定。而针对现场辐射剂量生物测定，Bensimon Etzol 等^[40-42] 搭建了一种可操作和便携移动的生物剂量测量设备 DosiKiT，可基于血液和毛囊样本对辐射受照人群进行事故现场测量，从而获得全身和局部的剂量评估。Zhong 等^[43] 则以微流控技术为基础，设计制作了一种便携式的集成设备，简化了 γ -H2AX 免疫荧光染色的

方案, 可在室温下 40 min 内实现全自动 γ -H2AX 免疫荧光染色, 实验结果呈线性剂量响应关系, 具有

自动化、高效、经济实用等特点。以上三者的比较总结于表 2 中。

Table 2 Comparison of automation/portable devices

表2 自动化/便携式设备比较

名称	功能			特点
	自动化	便携性	效率	
RABIT	√	×	325.5个样本/h	全自动、高样本吞吐量
DosiKiT	×	√	从采样到剂量估算全流程45 min	现场检测、全身及局部剂量快速评估
微流控设备	√	√	40 min内全自动染色	全自动、高效经济实用

4 总结与展望

随着核技术在国防事业、能源产业、农林业及医学诊断治疗中越来越广泛的应用, 大规模暴露于电离辐射环境的风险也在增加。辐射事故应急处置要求快速对受照人员进行剂量评估, 基于DNA损伤的 γ -H2AX生物剂量测定方法可在较短时间内对辐照剂量进行估算, 从而达到快速筛分受照人群以便于应急医学处置的目的。本文总结了近10年来国内外基于电离辐射生物标志物 γ -H2AX的检测方法研究进展, 作为电离辐射生物标志物, 为缩短检测时间, 提高检测效率, 对 γ -H2AX检测过程中的样品量、自动化图像分析技术、检测新技术等方面, 国外学者均开展了一定深度的研究, 国内学者则侧重于方法的应用和机制的研究, 在检测技术改进方面仍存在差距与不足。在快速辐射剂量估算、辐射应急分诊方面, 建立快速准确, 可便携自动化的高通量 γ -H2AX生物剂量测定方法是 γ -H2AX作为电离辐射生物标志物未来最重要的研究方向之一, 且具有极高的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Stope M B. Phosphorylation of histone H2A. X as a DNA-associated biomarker (Review). *World Acad Sci J*, 2021, **3**: 3
- [2] Raavi V, Perumal V, Paul S F D. Potential application of γ -H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2021, **787**: 108350
- [3] Rogakou E P, Pilch D R, Orr A H, *et al.* DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998, **273**(10): 5858-5868
- [4] Kuo L J, Yang L X. γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*, 2008, **22**(3): 305-309
- [5] Rothkamm K, Horn S. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 2009, **45**(3): 265-271
- [6] Sowa M, Reddig A, Schierack P, *et al.* Phosphorylated histone 2AX foci determination in capillary blood mononuclear cells. *J Lab Precis Med*, 2018, **3**: 45
- [7] Wojewodzka M, Sommer S, Kruszewski M, *et al.* Defining blood processing parameters for optimal detection of γ -H2AX foci: a small blood volume method. *Radiat Res*, 2015, **184**(1): 95-104
- [8] Moquet J, Barnard S, Rothkamm K. Gamma-H2AX biodosimetry for use in large scale radiation incidents: comparison of a rapid '96 well lyse/fix' protocol with a routine method. *PeerJ*, 2014, **2**(1): e282
- [9] Heylmann D, Kaina B. The γ H2AX DNA damage assay from a drop of blood. *Sci Rep*, 2016, **6**(1): 22682
- [10] Johnston M L, Young E F, Shepard K L. Whole-blood immunoassay for γ H2AX as a radiation biodosimetry assay with minimal sample preparation. *Radiat Environ Biophys*, 2015, **54**(3): 365-372
- [11] Lee J H, Hausmann M. Super-resolution radiation biology: from bio-dosimetry towards nano-studies of DNA repair mechanisms// Behzadi P. *DNA-damages and Repair Mechanisms*. Rijeka: IntechOpen, 2021: 43
- [12] Depes D, Lee J H, Bobkova E, *et al.* Single-molecule localization microscopy as a promising tool for γ H2AX/53BP1 foci exploration. *Eur Phys J D*, 2018, **72**: 158
- [13] Hausmann M, Neitzel C, Bobkova E, *et al.* Single molecule localization microscopy analyses of DNA-repair foci and clusters detected along particle damage tracks. *Front Phys*, 2020, **8**: 473
- [14] Hausmann M, Wagner E, Lee J H, *et al.* Super-resolution localization microscopy of radiation-induced histone H2AX-phosphorylation in relation to H3K9-trimethylation in HeLa cells. *Nanoscale*, 2018, **10**(9): 4320-4331
- [15] Liddle P, Jara-Wilde J, Lafon-Hughes L, *et al.* dSTORM microscopy evidences in HeLa cells clustered and scattered gammaH2AX nanofoci sensitive to ATM, DNA-PK, and ATR kinase inhibitors. *Mol Cell Biochem*, 2020, **473**(1): 77-91
- [16] Varga D, Majoros H, Ujfaludi Z, *et al.* Quantification of DNA damage induced repair focus formation *via* super-resolution dSTORM localization microscopy. *Nanoscale*, 2019, **11**(30): 14226-14236
- [17] Ruprecht N, Hungerbühler M N, Böhm I B, *et al.* Improved

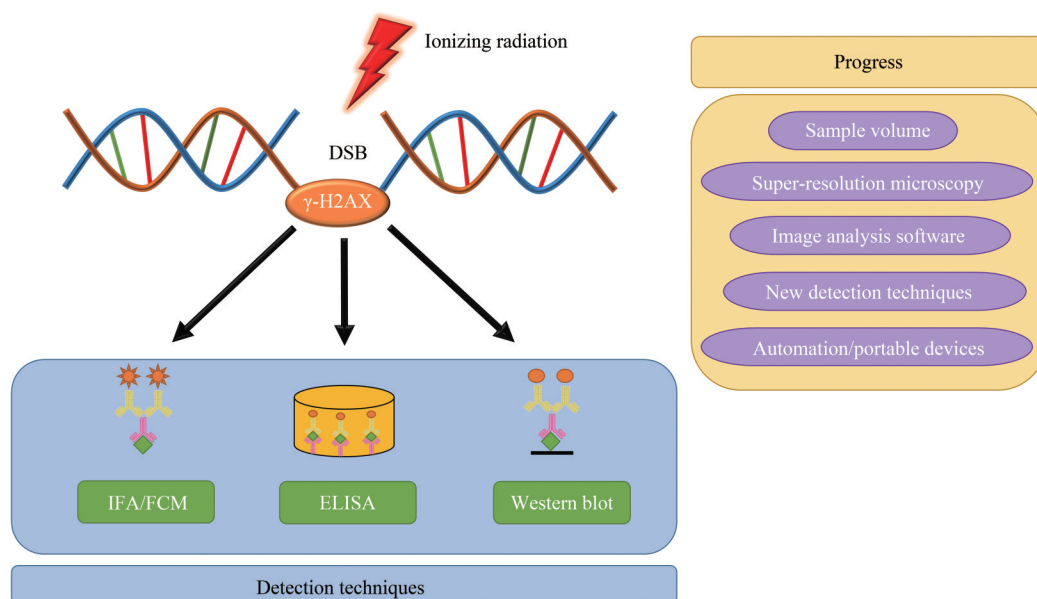
- identification of DNA double strand breaks: γ -H2AX-epitope visualization by confocal microscopy and 3D reconstructed images. *Radiat Environ Biophys*, 2019, **58**(2): 295-302
- [18] Schneider J, Weiss R, Ruhe M, *et al.* Open source bioimage informatics tools for the analysis of DNA damage and associated biomarkers. *J Lab Precis Med*, 2019, **4**: 1-27
- [19] Kataoka Y, Bindokas V P, Duggan R C, *et al.* Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells. *J Radiat Res*, 2006, **47**(3-4): 245-257
- [20] Zlobinskaya O, Dollinger G, Michalski D, *et al.* Induction and repair of DNA double-strand breaks assessed by gamma-H2AX foci after irradiation with pulsed or continuous proton beams. *Radiat Environ Biophys*, 2012, **51**(1): 23-32
- [21] Vicar T, Gumulec J, Kolar R, *et al.* DeepFoci: deep learning-based algorithm for fast automatic analysis of DNA double strand break ionizing radiation-induced foci. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, **19**: 6465-6480
- [22] González J E, Lee M, Barquinero J F, *et al.* Quantitative image analysis of gamma-H2AX foci induced by ionizing radiation applying open source programs. *Anal Quant Cytol Histol*, 2012, **34**(2): 66-71
- [23] Valente M, Voisin P, Laloi P, *et al.* Automated gamma-H2AX focus scoring method for human lymphocytes after ionizing radiation exposure. *Radiat Meas*, 2011, **46**(9): 871-876
- [24] Roch-Lefèvre S, Valente M, Voisin P, *et al.* Suitability of the r-H2AX assay for human radiation biodosimetry. *Curr Topics in Ionizing Radiation Research*, 2012, **2**: 21-30
- [25] Jucha A, Wegierek-Ciuk A, Koza Z, *et al.* FociCounter: a freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci. *Mutat Res*, 2010, **696**(1): 16-20
- [26] Lapytsko A, Kollarovic G, Ivanova L, *et al.* FoCo: a simple and robust quantification algorithm of nuclear foci. *BMC Bioinformatics*, 2015, **16**: 392
- [27] Memmel S, Sisario D, Zimmermann H, *et al.* FocAn: automated 3D analysis of DNA repair foci in image stacks acquired by confocal fluorescence microscopy. *BMC Bioinformatics*, 2020, **21**(1): 27
- [28] Lee Y, Wang Q, Shuryak I, *et al.* Development of a high-throughput gamma-H2AX assay based on imaging flow cytometry. *Radiat Oncol*, 2019, **14**(1): 150
- [29] Matsuzaki K, Harada A, Takeiri A, *et al.* Whole cell-ELISA to measure the gammaH2AX response of six aneugens and eight DNA-damaging chemicals. *Mutat Res*, 2010, **700**(1-2): 71-79
- [30] Tronnet S, Oswald E. Quantification of colibactin-associated genotoxicity in HeLa cells by In Cell Western (ICW) using gamma-H2AX as a Marker. *Bio-protocol*, 2018, **8**(6): e2771
- [31] Matsuda S, Ikura T, Matsuda T. Absolute quantification of γ H2AX using liquid chromatography - triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2015, **407**(18): 5521-5527
- [32] 瞿敏敏, 陈佳, 张雅姣, 等. 基于 γ -H2AX 检测的两种基因毒性体外测试方法的比较研究. *分析化学*, 2021, **49**(12): 2039-2047
- Qu M M, Chen J, Zhang Y J, *et al.* *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, **49**(12): 2039-2047
- [33] Runge R, Hiemann R, Wendisch M, *et al.* Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®. *Int J Radiat Biol*, 2012, **88**(5): 439-447
- [34] Yoo I Y, Oh J W, Cha H S, *et al.* Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer. *Ann Lab Med*, 2017, **37**(3): 240-247
- [35] Schouwens S, Bonnet M, Verschuereen P, *et al.* Value-added reporting of antinuclear antibody testing by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chem Lab Med*, 2014, **52**(4): 547-551
- [36] Chen Y, Zhang J, Wang H, *et al.* Design and preliminary validation of a rapid automated biodosimetry tool for high throughput radiological triage. *Proc ASME Des Eng Tech Conf*, 2009, **49002**: 61-67
- [37] Garty G, Chen Y, Salerno A, *et al.* The RABIT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. *Health Phys*, 2010, **98**(2): 209-217
- [38] Garty G, Chen Y, Turner H C, *et al.* The RABiT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. II. Technological developments. *Int J Radiat Biol*, 2011, **87**(8): 776-790
- [39] Garty G, Bigelow A W, Repin M, *et al.* An automated imaging system for radiation biodosimetry. *Microsc Res Tech*, 2015, **78**(7): 587-598
- [40] Bensimon Etzol J, Bouvet S, Bettencourt C, *et al.* DosiKit, a new immunoassay for fast radiation biodosimetry of hair and blood samples. *Radiat Res*, 2018, **190**(5): 473-482
- [41] Bensimon Etzol J, Valente M, Altmeyer S, *et al.* DosiKit, a new portable immunoassay for fast external irradiation biodosimetry. *Radiat Res*, 2018, **190**(2): 176-185
- [42] Entine F, Bensimon Etzol J, Bettencourt C, *et al.* Deployment of the DosiKit system under operational conditions: experience from a french defense national nuclear exercise. *Health Phys*, 2018, **115**(1): 185-191
- [43] Zhong R, Hou L, Zhao Y, *et al.* A 3D mixing-based portable magnetic device for fully automatic immunofluorescence staining of γ -H2AX in UVC-irradiated CD4+ cells. *RSC Adv*, 2020, **10**(49): 29311-29319

Progress in Detection of Ionizing Radiation Biomarker γ -H2AX*

LIU Ying, XIONG Zhong-Hua, XIA Bin-Yuan, CHEN Shan**

(Institute of Materials, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621907, China)

Graphical abstract



Abstract Ionizing radiation can lead to DNA double-strand breaks, resulting in rapid phosphorylation of histone H2AX to γ -H2AX at the location of double-strand breaks. The number of focal points formed at γ -H2AX aggregations in cells can be applied to the evaluation of DNA double-strand breaks, and is correlated with the radiation dose. Therefore, γ -H2AX can be used as a biomarker to evaluate the mutagenicity of ionizing radiation. It can also be used as a biological dosimeter of ionizing radiation to estimate individual exposure dose. Conventional detection methods of γ -H2AX aggregations include enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA), the fluorescent focus of which can be detected by fluorescence microscopy and flow cytometry. Through the investigation of literatures in the past ten years, most of the research work focus on the decrease of sample volume, the development of super-resolution microscopy to

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (11705170) and the Foundation from Institute of Materials CAEP (TP02201709, TCSQ2016310).

** Corresponding author.

Tel: 86-816-3620126, E-mail: qingmoheng@qq.com

Received: December 7, 2021 Accepted: March 15, 2022

obtain sharper images of γ -H2AX aggregations, various image analysis softwares to achieve automation detection and new detection techniques. Research on automation/portable devices is critical to realize point-of-care testing for radiation accident emergency response and medical treatment. In terms of rapid radiation dose estimation and radiation emergency triage, the establishment of a rapid, accurate, portable and automated high-throughput γ -H2AX biological dosimetry is one of the most important research directions. As a biomarker of ionizing radiation in the future, γ -H2AX detection technology has important application value in radiation biology research, radiation molecular epidemiology, radiation accident emergency response and medical treatment. This paper discusses the research progress and application prospect of detection methods based on ionizing radiation biomarker γ -H2AX.

Key words ionizing radiation, γ -H2AX, biomarker, biological dosimeter

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0379