

^{60}Co 射线辐照对耐辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 蛋白质含量的影响

孙翠凤 刘芬菊 孔向荣 陈剑 宁萍

(苏州大学放射生物学教研室 苏州 215007)

摘要 研究了耐辐射菌对 ^{60}Co 射线的辐射抗性, 观察不同剂量照射后, 细菌中蛋白质含量、辐照剂量及照射后培养不同时间的关系。应用平板菌落计数法, 计数不同剂量辐照后的克隆数, 计算存活率, 绘制剂量—存活曲线。采用紫外分光光度法检测细菌中蛋白质的含量。结果表明, 耐辐射菌的存活曲线呈肩型, 具有极强的辐射抗性。蛋白质的含量随着照射剂量的升高而不断增加, 当辐射剂量达到 5kGy 时, 蛋白质含量最高 ($p < 0.01$); 若受照剂量 $> 5\text{kGy}$ 时, 则蛋白质含量随受照射剂量的升高而逐渐降低。5kGy 辐照后, 随照射后温育时间的延长, 蛋白质含量不断降低, 培养时间为 6h, 蛋白质的含量最低 ($p < 0.01$), 与对照组(未受照射组)相比, 无显著性差异 ($p > 0.05$)。

关键词 耐辐射球菌, 辐射抗性, ^{60}Co 射线, 蛋白质含量

中图分类号 R811.5

耐辐射球菌 *Deinococcus radiodurans* 是 1956 年由美国科学家 Anderson 等^[1] 首次从辐射灭菌后变质的肉类罐头中分离出来的。是迄今为止发现的对电离辐射、紫外线、过氧化氢等一些 DNA 损伤剂都有极强抗性的微生物。许多科学家认为, 这种极强的抗辐射能力与其本身具有完善而高效的 DNA 修复系统有关。但是其修复机理至今仍知之甚少, 通过对该菌的研究可能对医学中抗放疗癌细胞的研究起着一定的促进作用。因此, 自耐辐射球菌被发现以来, 倍受微生物学家、放射生物学家和肿瘤研究人员的极大重视。本研究的目的是用 ^{60}Co 射线辐照耐辐射菌株, 研究其对射线的辐射抗性并测量细菌中蛋白质的总含量, 研究蛋白质含量与辐照剂量以及照射后培养不同时间的关系, 以蛋白质含量的变化阐明经受 5kGy 辐照, DNA 完全修复所需的时间, 并为进一步研究对辐射抗性起决定作用的抗辐射蛋白的抗辐射损伤机理, 为肿瘤放射治疗及辐射防护工作提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件

本研究应用耐辐射球菌 *Deinococcus radiodurans*

KD8301 和 KH3111。耐辐射球菌生长在胰蛋白胍葡萄糖酵母提取物培养基(TGY)培养液(0.5%胰蛋白胍、0.1%葡萄糖、0.3%酵母提取物), 或含 1.5%琼脂的 TGY 固体培养基上。液体培养则需振荡, 培养温度为 30℃, 当细胞的数量达到在 600nm 处的光吸收值(即 OD_{600}) 为 0.4—0.6 之间时终止培养。

1.2 ^{60}Co 射线辐照

取 1.1 培养的耐辐射菌液经过 4000r/min 离心 15min, 用 0.02mol/L PB (pH=7.4) 洗涤两次, 再用磷酸盐缓冲液(PB)悬浮细菌, 调节细菌的数量 OD_{600} 为 0.4。实验细菌分装成 6 份, 每份含 1.5mL 的悬浮菌液, 置于冰上用 ^{60}Co 源 射线辐照, 辐照剂量分别为 0、1、3、5、8、10kGy, 剂量率为 2kGy/h。每份平行 3 个样品, 重复实验 6 次。研究蛋白质含量与照射后培养时间关系时, 辐照前细菌的数量 OD_{600} 为 0.8, 照射后需继续培养的样品, 在 4℃ 条件下离心弃去 PB 缓冲液, 加入 3mL TGY 培养液, 30℃ 振荡培养, 培养时间分别为 2、4、6h, 培养结束后, 4℃ 离心弃去培养液, PB 洗涤两次, 再悬浮于等体积的 PB 缓冲液。

国家自然科学基金(39900039)资助

第一作者:孙翠凤,女,1976年8月出生,1999年毕业于烟台大学,生物化学专业,现攻读苏州大学放射医学硕士

通讯联系人:刘芬菊

收稿日期:初稿 2002-05-15,修回 2002-09-12

1.3 剂量-存活曲线的制作

将照射后的细菌分别取 5 L 菌液用 0.02mol/L 的 PB 缓冲液等比稀释至 10^{-4} 倍, 各取 100 L 均匀地涂抹在 TGY 半固体培养基上, 30 培养, 培养 48h 后计数所形成的菌落, 以对照组的存活分数为 100%, 绘制剂量-存活曲线。

1.4 细菌的破碎及蛋白质浓度的测定

分别取 1mL 悬浮在 0.02mol/L PB 中的菌液置于冰上并加溶菌酶 (Sigma) 使终浓度为 200 g/mL, 分次超声破碎, 冰上放置间歇 30s, 超声 30s, 总计 20min。4 条件下, 10000r/min 离心 30min, 吸取细胞上清液, 用紫外分光光度计测其在 280nm 处的光吸收值 (OD_{280}), 根据 OD_{280} 计算出蛋白质的浓度 (BSA 作标准蛋白)^[2]。

1.5 统计分析

实验结果采用 Student-Newman-Keuls 法检验。

2 结果

2.1 不同剂量的 射线辐照, KD8301 和 KH3111 的存活分数

图 1 表示耐辐射菌 KD8301、KH3111 经不同剂量的 射线辐照的存活分数, 绘制出剂量—存活曲

线, 为典型的肩型存活曲线, 在 5kGy 辐照剂量点之前, 存活率几乎均接近 100%, 有一个大的平肩, >5kGy 后, 存活率开始下降。耐辐射菌的这一肩型存活曲线充分说明了其对 射线具有极强的辐射抗性。

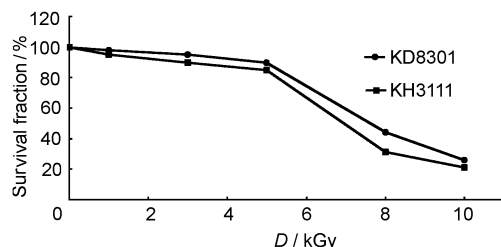


Fig.1 Survival survival of KD8301 and KH3111.

2.2 不同剂量辐照后, 耐辐射菌 KD8301、KH3111 的蛋白质含量

表 1 为不同剂量照射后, KD8301 和 KH3111 蛋白质的含量, 其与对照组相比较, 都明显增加 ($p < 0.01$)。随辐照剂量的升高, 蛋白质含量逐渐增加, 当辐照剂量为 5kGy 时, 蛋白质的含量达到最大值 ($p < 0.01$) 之后随辐照剂量的升高蛋白质含量逐渐降低。

Tab.1 The protein concentration of KD8301 and KH3111 after different irradiation dose (g/mL) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Dose	0 kGy	1 kGy	3 kGy	5 kGy	8 kGy	10 kGy
KD801	438.2 ± 24.2	541.6 ± 33.0	695.8 ± 32.5	1461.4 ± 87.0	1301.5 ± 98.0	790.7 ± 18.8
KH3111	362.6 ± 30.8	468.3 ± 37.6	731.7 ± 18.6	1396.5 ± 78.1	983.3 ± 96.9	809.5 ± 27.8

2.3 5kGy 辐照后, 温育不同时间细菌中蛋白质总含量

表 2 为 5kGy 的 射线照射后, 温育不同时间耐辐射菌蛋白质的含量。受照射后, 立即测蛋白质

的含量, 其值为最高 ($p < 0.01$), 随培养时间的延长, 2、4 和 6h, 蛋白质含量不断下降, 照射后培养 6h, 蛋白质的含量与对照组 (未受照组) 的相似 ($p > 0.05$)。

Tab.2 The effect of 5kGy on the protein concentration of bacterium after different cultural time dose (g/mL) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Dose/Time	0kGy/0h	5kGy/0h	5kGy/2h	5kGy/4h	5kGy/6h
KD8301	1049.7 ± 141.3	2176.1 ± 129.4	1834.8 ± 34.1	1420.5 ± 72.1	1063.7 ± 122.8
KH3111	1211.7 ± 208.7	2066.7 ± 43.6	1668.5 ± 55.0	1450.5 ± 69.8	1221.6 ± 121.6

3 讨论

耐辐射菌在首次被分离出来命名为 *Micrococcus radiodurans*, 80 年代初, 为了与其他球菌属相区分, 改名为 *Deinococcus radiodurans*^[3]。由于其对 DNA 损伤因子, 如电离辐射、紫外线等具有超强的抗性, 归因于其具有高效的 DNA 修复系统。经高水平辐射后, 适当的培养条件下, 耐辐射球菌能准确无误地修复每条染色体上 150—200 多个 DSB, 而一般细菌在同样条件下只能修复几个 DSB^[4,5]。耐辐射菌对电离辐射的抗性主要表现在剂量—存活曲线上, 它是典型的肩型存活曲线。耐辐射菌的肩型存活曲线充分说明了其极强的辐射抗性。

有关研究资料表明, 电离辐射的直接作用能引起细胞中 DNA 的损伤, 譬如 DNA 链断裂、DNA 交联等的损伤, 只有在 DNA 发生损伤时, 细胞中的参与 DNA 损伤修复的酶类及蛋白质因子才开始合成或合成的量增加^[6]。电离辐射的间接作用能在细胞内产生大量的自由基, SOD、CAT 和 POD 能有效清除细胞内对细胞毒害作用极强的活性氧自由基, 这些抗氧化酶类的酶活性的高低和量与细胞遭受的 DNA 损伤程度呈正相关^[7]。本研究结果表明, 当辐照剂量相对低时, 耐辐射菌受到的损伤程度相对小, 细菌的存活率高, 总蛋白含量较低, 是由于产生的修复酶类和其他蛋白质因子以及 CAT、SOD 和 POD 等防护酶的量相对少, 随着辐照剂量的增加, DNA 损伤程度加大, 参与 DNA 损伤修复的酶、蛋白质因子等类物质数量增多, 从而使得蛋白质含量亦增加, 在 5kGy 时, 细菌的存活率几乎为 100%。说明耐辐射菌能完全修复由 5kGy 辐照剂量所产生的 DNA 损伤, 此时, 蛋白质的含量达到最高, 辐照剂量高于 5kGy, 细菌的存活率降低, 虽然 DNA 的损伤程度加大, 因细菌

存活率的降低, 所以蛋白质的总量降低。经受 5kGy 剂量辐照, 立即测蛋白质的含量, 其值最高, 当 DNA 受到损伤时, 激发了细胞中修复酶及防护酶的合成, 之后随培养时间的延长, DNA 逐渐得到修复, 使已产生的蛋白质又降解, 其含量逐渐降低。辐照后 6h, DNA 完全修复, 原因是辐照后 6h 细菌的蛋白质含量与对照组 (未受照细菌) 相比较没有显著性差异 ($p>0.05$), 此结果与文献[8]所报道的一致。

致谢 本实验得到了苏州大学核医学院辐照室王春雷老师的大力支持和帮助, 在此表示衷心的感谢。

参考文献

- 1 Anderson A W, Nordan H C, Cain R F et al. Food Technol, 1956, 10: 575-578
- 2 历朝龙. 生物化学与分子生物学实验技术. 杭州: 浙江大学出版社, 2000. 46-47
LI C L. Laboratory methods biochemistry molecular biology. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2000. 46-47
- 3 Moseley B E B. Photochem Photobiol Rev. Univer Edinburgh: 1983. 223-274
- 4 Daly M J, Ouyang L, Fuchs P et al. J Bacteriol, 1994, 176 (12): 3508-3517
- 5 Minton K W. Mutation Research, 1996, 363(1): 1-7
- 6 Carrol J D, Michael J D, Kenneth W M. J Bacteriol, 1996, 178 (1): 130-135
- 7 Chou F I, Tan S T. J Bacteriol, 1990, 172(4): 2029-2035
- 8 Battista J R. Current Biology, 2000, 10(5): R204-205

EFFECT OF ^{60}Co - RAYS IRRADIATION ON THE PROTEIN CONTENTS IN *Deinococcus radiodurans*

SUN Cuifeng LIU Fenju KONG Xiangrong CHEN Jian NING Ping
(Nuclear Medical School of Soochow University, Suzhou 215007)

ABSTRACT In this paper, the radioresistance of bacterium *Deinococcus radiodurans* to ^{60}Co - rays and the relationship between the protein content in the bacterium and the irradiation dose as well as the time after irradiation were studied. By counting the colonies on the plates which grew up

from the irradiated and the control bacterium, the survival rate at each irradiation dose was calculated. The protein concentration was measured with the ultraviolet spectrophotometry. The results showed that the typical survival curve of *Deinococcus radiodurans* had a wide shoulder up to 5kGy, characterizing the radioresistance of the bacterium. The protein concentration increased with increasing dose, reaching the maximum at 5kGy. With time prolongation after 5kGy irradiation, the protein expressed in the bacterium reduced. And the lowest protein concentration, basically the same as the control, was observed 6h after the irradiation.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans*, Radioresistance, ^{60}Co -ray, Protein concentration

CLC R811.5