

抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* 辐射抗性研究

孔向荣 杜泽吉

(苏州医学院放射医学研究所 苏州 215007)

摘要 观察了野生型抗辐射菌 *Deinococcus radiodurans* KD8301 及其修复缺陷突变体 KH3111 对 γ 射线的抗性程度,探讨了影响辐射抗性的有关因素。KD8301 和 KH3111 经大剂量 γ 射线照射(0.5~10kGy),制作剂量-存活曲线;利用荧光分光光度法测定细胞的 DNA 含量。结果表明,野生型的 KD8301 对射线具有显著抗性,推定的 LD₉₉ 为 9.5kGy,而其突变体 KH3111 的抗性明显减弱,LD₉₉ 为 2.4kGy;指数生长期的 KD8301 对射线的抗性明显低于稳定期的,LD₉₉ 分别为 5.2kGy 和 9.5kGy;指数生长期和稳定生长期细菌细胞内 DNA 相对含量无明显差异,说明 DNA 的相对含量与细菌的辐射抗性无密切关系,即辐射抗性的决定因素不是 DNA 的相对含量,而是细菌所处的生长状态。

关键词 抗辐射细菌, γ 射线, 辐射抗性

Deinococcus radiodurans 是一种革兰氏阳性、产生红色色素的非孢子微球菌,它是在 1956 年 Anderson 等^[1]从经过大剂量照射灭菌后的肉罐中分离出来的,由于其对辐射及其他 DNA 损伤剂都有极强的抗性,故倍受生物医学界的重视。KD8301 是野生型抗辐射菌的一种,经化学诱变后得到其 DNA 修复缺陷型突变体 KH3111。本研究旨在利用这一对抗辐射菌,阐明其抗辐射程度及辐射抗性的差异,同时研究影响抗性的有关因素。

1 材 料 和 方 法

1.1 细菌株及生长条件

野生型的抗辐射菌 KD8301 和其突变体 KH3111(日本原子力研究所生物技术研究室馈赠)。大肠杆菌(*E. coli*)株为 JM109。抗辐射菌生长在 TGY[0.5%胰蛋白胍(Difco),0.1%葡萄糖,0.3%酵母提取物(Difco)]培养基中,或生长在含 1.5%琼脂(Difco)的 TGY 半固体培养基上,培养温度为 30℃。大肠杆菌 JM109 生长在 LB-M(1%胰蛋白胍,0.5%酵母提取物,1% NaCl)培养液中,或生长在含 1.5%琼脂的 LB-M 半固体培养基上,生长温度为 37℃。

1.2 照射条件

收获处于指数生长期(50h 左右)或稳定期(72h)的抗辐射菌,用磷酸缓冲液(PB, 66.7mmol/L pH7.0)洗涤细菌 2 次,最后悬浮于同体积的 PB 中,分装为 1mL/管,在室温下经 γ 射线照射 0~10kGy,剂量率分别为 1kGy/h(2kGy 以下)和 4kGy/h(3kGy 以上)。

日本科学技术厅(STA)资助项目

收稿日期:初稿 1998-10-20; 修回 1999-01-29

1.3 剂量-存活曲线的制作

照射后的细菌用 PB 等比稀释 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ (便于准确计数菌落), 各取 $100\mu\text{L}$ 均匀地涂抹在 TGY 半固体培养基上 (KD8301 和 KH3111) 或 LB-M 培养基上 (JM109), 前者置 30°C 、后者置 37°C 条件下培养。对于抗辐射菌, 培养 3d 后计数所形成的菌落, 而大肠杆菌在培养后 24h 即可计数菌落。以对照组的存活分数为 100%, 在半对数坐标纸上制作剂量-存活曲线, 进而确定 LD_{99} 值。

1.4 细胞内 DNA、蛋白质含量测定

采用荧光分光光度法测定 DNA 含量, Lowry 氏法测定蛋白质含量。样品处理及步骤见文献[2]。

2 实验结果

2.1 KD8301、KH3111 及 JM109 对辐射抗性的比较

稳定期 KD8301、KH3111 及 JM109 的剂量-存活曲线见图 1。野生型的 KD8301 对 γ 射线表现出明显的抗性, 剂量-存活曲线有一个宽大的肩区, LD_{99} 值为 9.5kGy , 说明其对辐射损伤具有较强的修复能力。KH3111 对辐射的抗性不明显, LD_{99} 为 2.4kGy , 由此推测其突变的位点在具有重要修复功能的基因内。与 KD8301 比较, *E. coli* JM109 对辐射几乎没有抗性, LD_{99} 为 0.6kGy 。

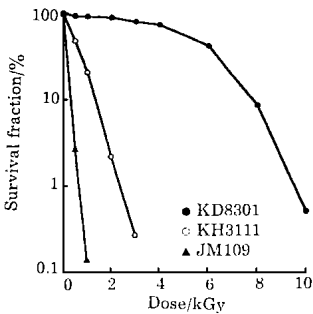


Fig. 1 Dose-survival curves of KD8301 and KH3111

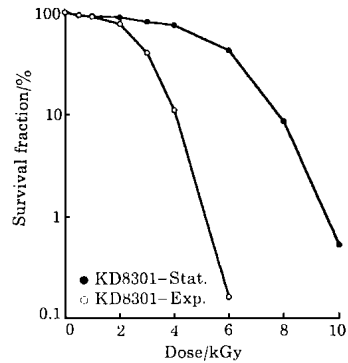


Fig. 2 Dose-survival curves shown at different phases

2.2 不同生长时相的 KD8301 对辐射抗性的比较

处于指数生长期的 KD8301 (KD8301-Exp.) 和稳定生长期的 KD8301 (KD8301-Stat.) 的剂量-存活曲线见图 2。与稳定期比较, 指数生长期的 KD8301 对辐射的抗性明显减弱, 表现为存活曲线斜率变大、肩区变小, LD_{99} 为 5.1kGy 。

2.3 不同生长时相 KD8301 细胞 DNA 相对含量的变化

细菌细胞内 DNA、蛋白质含量见表 1。指数生长期的细胞, DNA 含量明显高于稳定期 ($p < 0.05$), 但相对含量 (DNA/蛋白质), 两者间差别不显著 ($p > 0.05$), 表明细胞内 DNA 的相对含量与辐射抗性无密切关系, 说明 DNA 的相对含量不是细菌细胞辐射抗性的决定因素。

Tab.1 Contents of DNA and protein of KD8301 grown at different phases

 $(10^{-4} \text{g/cell}, \bar{x} \pm s)$

| Phases | Contents | | DNA:Protein/% |
|--------|----------|---------|---------------|
| | DNA | Protein | |
| Exp. | 8.41±1.4 | 163±21 | 5.2 |
| Stat. | 6.57±1.6 | 158±13 | 4.2 |

 $n=10$

3 讨论

抗辐射菌在首次被分离出来后,定名为 *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(电离辐射、丝裂霉素、紫外线等)具有超强的抗性,即具有极强的 DNA 修复功能,如能克隆其相关的修复基因并转导于哺乳类细胞,可大大提高细胞的辐射抗性;另外,可通过基因工程的方法,制备抗辐射蛋白质作为辐射防护剂,所以对该菌的研究具有明显的潜在应用价值。据报道^[4,5],抗辐射菌在受 15kGy γ 射线照射后仍能保持其存活能力,而一般细菌在 5kGy γ 射线照射后即可全部灭活。前者能无误地修复每条染色体上 100 多个 DNA 双链断裂(DSB),而后者只能修复几个 DSB。这种抗辐射能力归因于抗辐射菌的高效而准确的 DNA 修复系统。

80 年代后,对抗辐射菌的研究十分活跃,随着化学诱导突变的成功,获得了一系列突变型敏感株,使得分离和克隆抗辐射菌的 DNA 修复基因成为可能。KH3111 就是一例,本工作正在对其突变位点的确定加以研究。初步结果表明,该突变发生在一个重要的 DNA 修复基因上的一个点,该基因已被克隆^[6]。

文献[7]认为,细胞内 DNA 相对含量是衡量细菌辐射抗性的一个指标,相对含量高,辐射抗性大。本研究表明, *Deinococcus radiodurans* 的辐射抗性与其 DNA 相对含量无密切关系,表现为抗性大的稳定期 KD8301 的 DNA 相对含量与抗性明显减弱的指数生长期的 KD8301 的 DNA 相对含量间无明显差异。生长时相可明显影响辐射抗性,是抗辐射菌辐射抗性的决定因素,可能的原因是不同生长时相,其形态特征不同(二联体或四叠体)^[8],细胞内敏感靶的大小及数量不同,进而表现出对辐射的抗性不同。

参 考 文 献

- 1 Anderson A W, Nordan H C, Cain R F *et al.* Food Technol, 1956, **10**:575~578
- 2 Freedman M, Bruce A. Int J Radiat Biol, Related Stud Phys Chem Med, 1971, **19**:111~121
- 3 Moseley B M B. Photo Chem Photobiol Rev, 1983, **7**:223~274
- 4 Daly M J, Ouyang L, Fuchs P *et al.* J Bacteriol, 1994, **176**:3508~3517
- 5 Minton K W. Mutat Res, 1996, **363**:1~7
- 6 DU Zeji, Issay Narumi, Hiroshi Watanabe. Abstract of the International Conference on Diagnosis and Treatment of Radiation Injury. 1998, 8~9, Rotterdam, the Netherland
- 7 Dickie N, Dennis D, Thatcher F. Can J Microbiol, 1990, **14**:799~803
- 8 DU Zeji, Takahashi Y, Narumi I. Acta Academiae Medicinae Suzhou (in Chinese), 1998, **18**:1131~1133

CHARACTERIZATION OF THE RADIORESISTANCE IN THE RADIORESISTANT BACTERIUM *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

KONG Xiangrong DU Zeji

(Institute of Radiation Medicine, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT In this study, the radioresistance of wild type *Deinococcus radiodurans* KD8301 and the factors affecting the radioresistance were investigated. KH³¹¹¹ which was a DNA repair mutant of KD8301 (Zeji Du, 1998) was used to be compared with KD8301. *Deinococcus radiodurans* was discovered by Anderson *et al* (1956) in X-ray sterilized canned meat that was found to have undergone spoilage. This bacterium and other species of this genus share extreme resistance to ionizing radiation and other agents that damage DNA. Wild type KD8301 and its sensitive mutant KH³¹¹¹ were irradiated with ⁶⁰Co γ -ray at the dose range 0.5~10kGy. Dose-survival fraction curves were made and the radioresistances were determined by LD₉₉. The relative contents of DNA in cells were measured by Fluorescence Spectrophotometry (Freedman and Bruce, 1971). The results indicated that wild type KD8301 possesses more radioresistant than its mutant KH³¹¹¹, LD₉₉ were 9.5kGy and 2.4kGy respectively. KD8301 grown at exponential phase showed a decreased resistance to radiation, and the LD₉₉ was 5.1kGy. No differences of DNA/protein in cells were found between the exponential phase and the stationary phase. The results could be concluded that wild type KD8301 possesses remarkable radioresistance, but this ability was decreased or disappeared after mutation (in KH³¹¹¹). None DNA relative content other than the growthstages were determinant factors of radioresistance in *Deinococcus radiodurans*. This results were different from other report (Dickie N *et al*, 1990). The cellular mechanisms might be the differences of the bacterium cell morphology between the exponential phase and the stationary phase. Recently, the mutation site of KH³¹¹¹ which was mutated chemically from wild type KD8301 was identified (Zeji Du, 1998). One base pair changed in the novel gene *prrA* which was isolated from KD8301 genomic DNA. This point mutation was confirmed to be responsible for the sensitivity of KH³¹¹¹ to γ -ray and other DNA-damaging agents.

KEYWORDS Radioresistant bacterium, γ -ray, Radioresistance