

芽胞杆菌 T61 的辐射抗性和 伽玛射线辐照后蛋白质组的变化分析

宣慧娟 李利 白明艳 孙云峰 万平 杨志伟

(首都师范大学生命科学学院 北京 100048)

摘要 采用辐射生存率测定、双向电泳和 MALDI-TOF/TOF 质谱分析方法,对芽胞杆菌 T61 的 γ -射线辐射抗性和辐射后的蛋白质组学进行分析。结果表明,T61 的 D_{10} 值为 4 kGy,远高于辐射敏感的大肠杆菌。在 10 kGy γ -射线辐照后,34 个蛋白质出现显著变化,包括多种抗氧化酶类、核苷酸合成代谢酶类、能量代谢酶类、转录相关因子、蛋白质合成与更新相关因子。其中,一些抗氧化防御系统重要成员上调表达,暗示出抗氧化保护在芽胞杆菌 T61 的辐射抗性中发挥重要作用。

关键词 芽胞杆菌,辐射抗性,蛋白质组分析,抗氧化保护

中图分类号 Q691, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.030204

生物体辐射抗性的机理一直是人们关注的热点。耐辐射奇异球菌(*Deinococcus radiodurans*)是迄今发现的具有极强辐射抗性的微生物之一,对其辐射抗性机制的研究也最为透彻^[1-5]。迄今为止,大量研究主要集中在 DNA 修复能力方面^[6-8]。近年来,Daly 等^[9-10]认为抗氧化保护是辐射抗性的关键因素。这一假说提出电离辐射可以导致水光解,产生的活性氧自由基(ROS)会损伤核酸、蛋白质和脂类等生物大分子。因此推测有机体抗氧化能力的高低决定了其辐射生存率。在耐辐射奇异球菌中,研究表明 Mn 复合物是 ROS 的有效清除剂,但不同生物体可能具有不同的辐射抗性机制^[11]。

芽胞杆菌也存在辐射抗性现象。蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)的表面 S-层蛋白可赋予细胞更强的辐射抗性^[12]。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)的非同源末端连接(NHEJ)参与了辐射后 DNA 的修复^[13]。在巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)等其它芽胞杆菌中,电离辐射可以影响多个细胞代谢途径,包括 DNA 重组、蛋白质更新和胁迫响应机制等^[14-18]。但目前对芽胞杆菌辐射抗性机理的研究还十分有限。

芽胞杆菌 T61(*Bacillus* sp. T61)是从西藏土样中分离得到的一株具有较强辐射抗性的菌株。本研究测定了该菌株对 γ -射线的辐射抗性,并研究了 γ -射线

辐照后芽胞杆菌 T61 在蛋白质组水平发生的变化,以期发现细菌辐射抗性的新机制,拓展对生物体辐射抗性的认识。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和培养条件

本研究所用菌株为芽胞杆菌 T61,来自西藏冈巴拉山土样,由本实验室分离保存。对照菌株 *D. radiodurans* (CGMCC 1.633) 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, *E. coli* K12 由中国农业科学院张维研究员馈赠。芽胞杆菌 T61 和耐辐射奇异球菌用 TGY 培养基(0.5%胰蛋白胨、0.3%酵母提取物、0.1%葡萄糖)30 °C 培养, *E. coli* K12 用 LB 培养基(1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl) 37 °C 培养。

1.2 主要试剂和仪器

B-PER 细菌总蛋白抽提试剂盒(Thermo scientific); 双向电泳相关试剂(GE healthcare); Ultrospec 3100 pro 紫外可见分光光度计(GE healthcare); Ettan IPGphor 3 等电聚焦仪(GE healthcare); 垂直电泳仪(BIO-RAD); ImageScanner

基金资助:北京市属高等学校人才强教深化计划—极端环境植物微生物资源挖掘(2010)资助

第一作者:宣慧娟,女,1982年1月出生,2012年于首都师范大学获硕士学位,E-mail: xhj1ucky2008@163.com

通讯作者:杨志伟,博士,副教授,E-mail: yangzw@cnu.edu.cn

收稿日期:初稿 2014-02-25; 修回 2014-03-24

III 扫描仪(GE healthcare); 4800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer (ABI); ⁶⁰Co γ -射线源(北京大学化学与分子工程学院应用化学系钴源室)。

1.3 芽胞杆菌 T61 的 γ -射线辐射抗性的分析

将芽胞杆菌 T61 菌株接种于 TGY 培养基中, 于 30 °C 振荡培养至对数早期($A_{600}=0.3-0.4$)。离心收集菌体, 用 0.1 mol·L⁻¹ 的磷酸钾缓冲液(pH7.0)洗一次, 并重新悬浮于等体积的磷酸钾缓冲液中。取 1.5 mL 菌液加到 1.5 mL EP 管中, 室温下(10–20 °C)进行 ⁶⁰Co γ -射线辐照(剂量率 10 Gy·min⁻¹), 辐射剂量分别为 2、4、6、8 和 10 kGy。辐射后, 分别用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液适当稀释, 取稀释液涂布于 TGY 平板, 30 °C 培养。计算辐射存活率。以对数早期 *D. radiodurans* 和 *E. coli* K12 细胞为对照。

1.4 辐射处理和细胞可溶性蛋白的提取

将培养至对数早期($A_{600}=0.3-0.4$)的芽胞杆菌 T61 菌液分为两部分, 一部分进行 10 kGy ⁶⁰Co γ -射线辐射, 另一部分作为对照, 同样条件下放置, 未经辐射。辐射后离心收集菌体, -20 °C 储存。

处理组(γ -射线辐射)和对照组(未辐射)菌体各 3 g, 分别悬浮于适当体积的 B-PER® Reagent (Pierce) 中, 补加 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMSF 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶菌酶, 轻微摇动 20 min。4 °C 15000 g 离心 15 min, 上清液转移至新管, 加入 1.2 倍体积的 Tris 饱和酚, 冰上涡旋 20 min。4 °C 20000 g 离心 20 min, 酚相(下相)转移至新管, 加入 5 倍体积 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵(甲醇配制), 混匀, -20 °C 静置 2 h。4 °C 20000 g 离心 10 min, 沉淀用无水乙醇和丙酮(含 0.07% β -巯基乙醇)各洗一次, 冷冻干燥, -20 °C 保存。

1.5 双向电泳分离蛋白质

将蛋白质样品溶于适量上样缓冲液(8 mol·L⁻¹ Urea, 2% CHAPS, 50 mmol·L⁻¹ DTT 和 0.5% IPG buffer pH=4–7)中, 采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。按照生产厂商(GE Healthcare)的使用说明进行双向电泳分析。首先取 340 μL 样品(含 800 μg 蛋白)加入水化盘中, 放入 18 cm 的胶条(18 cm, pH 4–7), 水化 18 h。水化结束后, 采用 Ettan IPGphor III 进行等电聚焦, 聚焦程序为 250 V, 3 h; 500 V, 2 h; 1000 V, 1 h; 10000 V, 3 h; 10000 V, 100000 Vh;

500 V, 20 h。聚焦完毕, 平衡后进行第二向 SDS-PAGE, 分离胶浓度为 12.5%。用考马斯亮蓝 G-250 染液染色过夜, 次日进行脱色。将脱色后的凝胶用 ddH₂O 清洗, 采用 ImageScanner III 扫描仪进行图像采集, 用 BIO-RAD PDQuestTM 2-D Analysis Software 8.0.1 对图像进行分析。

处理组和对照组分别提取了 3 次蛋白质样品, 每个样品至少进行 2 次双向电泳分离。从凝胶上切取表达量发生 2 倍以上变化的蛋白质样点进行质谱分析。

1.6 质谱分析和差异蛋白的数据库查询

差异蛋白送交上海中科新生命生物科技有限公司进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析。采用 MASCOT 搜索软件在 NCBI 非冗余库 (NCBI nr) 中进行肽谱比对, 根据蛋白质得分(C. I. % >95%)、肽段的匹配数目(≥ 5)和序列覆盖度(>15%)等评价蛋白质鉴定的可靠性。

2 结果与讨论

2.1 芽胞杆菌 T61 的 γ -射线辐射抗性分析

芽胞杆菌 T61 对 γ -射线的辐射抗性远高于对照菌株大肠杆菌 K12。在本实验条件下, 当辐射剂量为 1 kGy 时, 大肠杆菌 K12 的生存率接近于 0.0001%, 而 T61 的生存率约为 40%。随着辐射剂量的增加, T61 存活率下降, D_{10} 为 4 kGy。当辐射剂量为 10 kGy 时, 存活率为 0.002%, 比耐辐射奇异球菌低 100 倍(见图 1)。

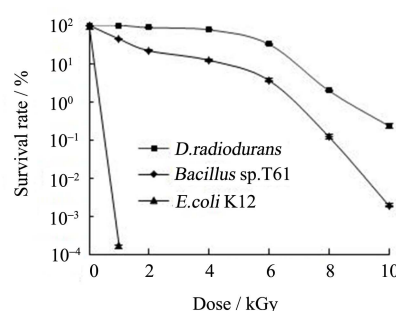


图 1 芽胞杆菌 T61 γ -射线辐照后的存活曲线

Fig.1 Survival curves of strain *Bacillus sp. T61* after γ -ray irradiation

2.2 γ -射线辐射后芽胞杆菌 T61 蛋白组的变化

对处理组(γ -射线辐射)和对照组(未辐射)可溶性蛋白进行双向电泳分析, 代表性电泳图谱如

图 2 所示。在每块胶上可分离得到 900 多个蛋白点，这些蛋白点主要集中在分子量 20–100 kDa，pH4–7 的范围内。与未经辐射的蛋白质样品相比，10kGy ^{60}Co γ -射线辐射后至少有 30 个蛋白质点出现显著变化。其中 22 个蛋白点上调为辐射前的两倍以上，8 个蛋白点下调为辐射前的二分之一以下。

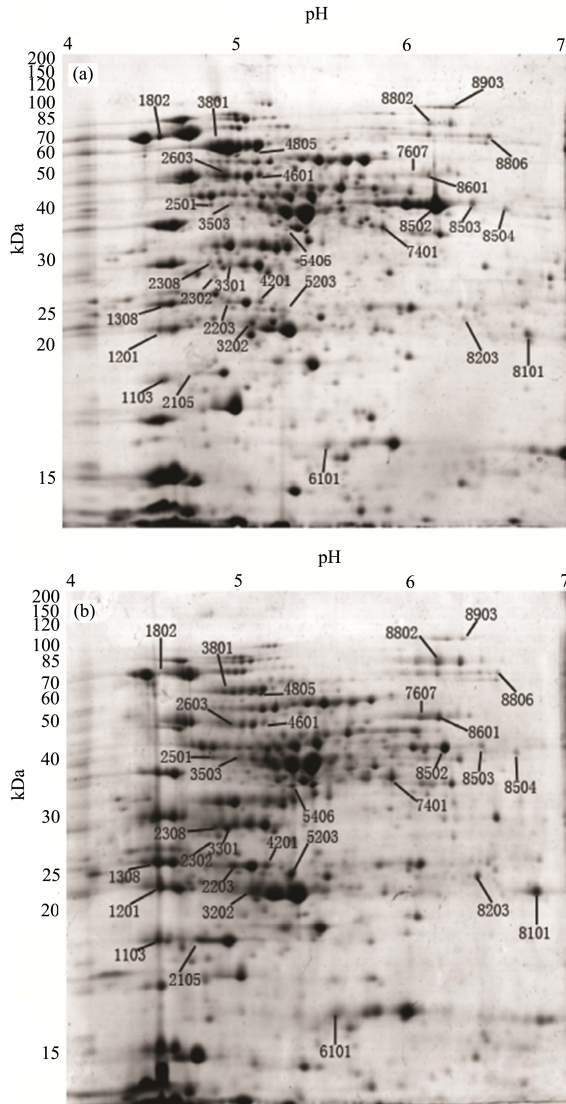


图 2 辐照前(a)后(b)芽胞杆菌 T61 的蛋白质组图谱
Fig.2 Protein profile of *Bacillus* sp. T61 cells before (a) and after (b) irradiation

根据双向电泳的分析结果，对辐射后发生显著变化的 30 个蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析，鉴定结果如表 1 所示。其中有 4 个蛋白点(2203, 3202, 4601, 6101)含有两种蛋白，因此 30 个蛋白点包括 34 种蛋白质，其中 25 个蛋白质上调，9 个蛋白质下调。进一步根据 NCBI 蛋白相邻类的聚簇分

析(Cluster of orthologous groups of proteins, COGs)对这些差异蛋白质进行了分类，它们分属信息贮存和加工、细胞过程和信号、代谢和未鉴定蛋白四大类，主要涉及细胞的抗氧化防御、核苷酸代谢、能量代谢、转录以及蛋白质的翻译和更新等过程。

在这些差异表达的蛋白质中，引人注目的是，一大组抗氧化酶类在辐射后上调表达，包括醛-酮还原酶(蛋白点 2308 和 5406)、巯基过氧化物酶(蛋白点 2105)、烷基过氧化氢还原酶(蛋白点 1201)、Mn-超氧化物歧化酶(蛋白点 3202)和硝基还原酶家族蛋白(蛋白点 3202)等(图 3)。在耐辐射奇异球菌中也观察到超氧化物歧化酶(SOD)等在辐射后表达量增加^[19]。本研究首次发现醛-酮还原酶(AKR)在辐射后显著上调表达。由于醛-酮还原酶是一种 NAD(P)H 依赖型的氧化还原酶类，可以催化多种脂肪族和芳香族醛、酮类物质的还原^[20]，我们推测醛-酮还原酶可能参与了辐射后脂类过氧化物的解毒过程，但具体机制有待进一步研究。

在对抗辐射导致的氧化胁迫方面，除抗氧化酶类上调之外，一些可以减少活性氧自由基生成的酶类也发生了变化。琥珀酸脱氢酶(蛋白点 8802)在辐射后上调 5.2 倍，该酶氧化还原中心的有效排列可以使电子快速转移给泛醌，从而减少了电子传递过程中自由基的产生^[21]。亚硫酸还原酶 β -亚基(蛋白点 8806)和 4-羟基-3-甲丁基-2-烯-1-基-二磷酸合成酶(GcpE, 蛋白点 8504)分别具有一个[4Fe-4S]簇，该铁硫簇容易受到 O_2^- 和 H_2O_2 的攻击，继而产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)^[22-23]。辐射后亚硫酸还原酶 β -亚基和 GcpE 下调，从而可以进一步减少辐射后自由基的生成。

辐射后芽胞杆菌 T61 下调有氧氧化途径，而以酵解为获得能量的主要方式，这一点与耐辐射奇异球菌十分相似^[3]。辐照后，可以观察到参与酵解途径的一些酶类，例如磷酸丙糖异构酶(蛋白点 1308)和果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(蛋白点 3301)和乳酸脱氢酶(蛋白点 7401)上调表达，而三羧酸循环(TCA)酶类，例如丙酮酸脱氢酶复合体 E3(蛋白点 4805)和丙酮酸脱氢酶 E1 α 亚基(蛋白点 8503)下调表达。此外，芽胞杆菌还可能利用细胞内其它代谢物获得能量，例如丁醇脱氢酶(蛋白点 3503)和聚羟基烷酸合酶(蛋白点 2203)在辐射后上调，二者分别参与丁醇^[24]和聚羟基烷酸(PHAs)^[25]的代谢。

表 1 γ -射线辐射后芽胞杆菌 T61 差异蛋白质的功能注释Table 1 Functional annotation of the cellular proteins changed in *Bacillus* sp. T61 after γ -ray irradiation

功能 Function	编号 Spot No.	功能注释 Annotation	Gi 号 GI No.	变化倍数 a Fold change a ($\bar{x} \pm s$)
信息贮存和加工 Information storage and processing				
翻译, 核糖体结构和 生物发生 Translation, ribosomal structure and biogenesis	8101	核糖体再循环因子 Ribosome recycling factor	294500908	2.1 ± 0.2
转录 Transcription	2603	翻译延伸因子 Tu Translation elongation factor Tu	295702348	0.3 ± 0.1
转录 Transcription	1103	转录延伸因子 GreA Transcription elongation factor GreA	294501340	3.1 ± 0.3
细胞过程和信号 Cellular processes and signaling				
翻译后修饰, 蛋白质 更新, 分子伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2105	巯基过氧化物酶 Thiol peroxidase	294501531	4.6 ± 0.2
	1201	烷基过氧化物还原酶 Alkyl hydroperoxide reductase	294498101	2.1 ± 0.2
	6101	多肽脯氨酰顺反异构酶亲环蛋白型 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	294501125	3.2 ± 0.2
	1802	触发因子 Trigger factor	295706777	0.5 ± 0.1
	8903	ATP-依赖的 Clp 蛋白酶 ClpC ATP-dependent Clp protease, ClpC	294496954	0.5 ± 0.1
代谢 Metabolism				
能量生成和转换 Energy production and conversion	8802	琥珀酸脱氢酶, 黄素蛋白亚基 Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	295706808	5.1 ± 0.1
	2308	醛-酮还原酶家族 Aldo/keto reductase family	384048501	6.1 ± 0.2
	5406	醛-酮还原酶家族氧化还原酶 Aldo/keto reductase family oxidoreductase	295703177	2.6 ± 0.4
	3202	硝基还原酶家族蛋白 Nitroreductase family protein	295703427	2.2 ± 0.2
	7401	L-乳酸脱氢酶 L-lactate dehydrogenase	295702685	2.3 ± 0.2
	3503	NADH-依赖的丁醇脱氢酶 A NADH-dependent butanol dehydrogenase A	295707006	2.1 ± 0.2
	3801	1-吡咯啉-5-羧酸酯脱氢酶 1 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 1	294500568	2.0 ± 0.1
	4805	丙酮酸脱氢酶复合体 E3 Pyruvate dehydrogenase complex E3	295703465	0.4 ± 0.1
	8503	丙酮酸脱氢酶复合体 E1 Pyruvate dehydrogenase complex E1	295703462	0.5 ± 0.1
碳水化合物转运和代谢 Carbohydrate transport and metabolism	1308	磷酸丙糖异构酶 Triosephosphate isomerase	295707111	2.5 ± 0.2
	3301	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	294501887	2.1 ± 0.1
	4601	磷酸甘油酸激酶 Phosphoglycerate kinase	294501762	0.6 ± 0.1
氨基酸转运和代谢 Amino acid transport and metabolism	7607	丝氨酸羟甲基转移酶 Serine hydroxymethyltransferase	294501872	4.6 ± 0.2
	8601	丝氨酸羟甲基转移酶 Serine hydroxymethyltransferase	294501872	2.2 ± 0.2
	2501	肽酶 T Peptidase T	295706516	2.0 ± 0.1
	4601	氨基肽酶 2 Aminopeptidase 2	294499610	0.6 ± 0.1

续表				
功能 Function	编号 Spot No.	功能注释 Annotation	Gi 号 GI No.	变化倍数 ^a Fold change ^a ($\bar{x} \pm s$)
核酸转运和代谢 Nucleotide transport and metabolism	2302	磷酸核糖甲酰甘氨酸合酶 I Phosphoribosylformylglycinamide synthase I	294497098	4.7 ± 0.2
	5203	腺苷酸激酶 Adenylate kinase	294497006	3.2 ± 0.2
	2203	鸟苷酸激酶 Guanylate kinase	294500988	2.2 ± 0.2
	4201	鸟苷酸激酶 Guanylate kinase	294500988	2.1 ± 0.1
辅酶转运和代谢 Coenzyme transport and metabolism	8203	前咕啉-8X 甲基变位酶 CbiC Precorrin-8X methylmutase CbiC	295704723	2.7 ± 0.2
脂转运和代谢 Lipid transport and metabo- lism	8504	4-羟基-3-甲基-2-烯-1-基-二磷酸合酶 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	384044890	0.5 ± 0.1
	2203	聚羟基烷酸合酶 PHA synthase	294497996	2.2 ± 0.2
无机盐转运和代谢 Inorganic ion transport and metabolism	3202	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (Mn)	295706606	2.2 ± 0.2
	8806	亚硫酸还原酶(NADPH)血红素蛋白, β 组分 Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein, β -component	295705236	0.3 ± 0.1
未鉴定的 功能未知 Poorly characterized Function unknown	6101	YrhD 类似蛋白 YrhD-like protein	384044411	3.2 ± 0.2

注：a 变化倍数：辐照处理/对照。Note: fold of change: irradiated group /control.

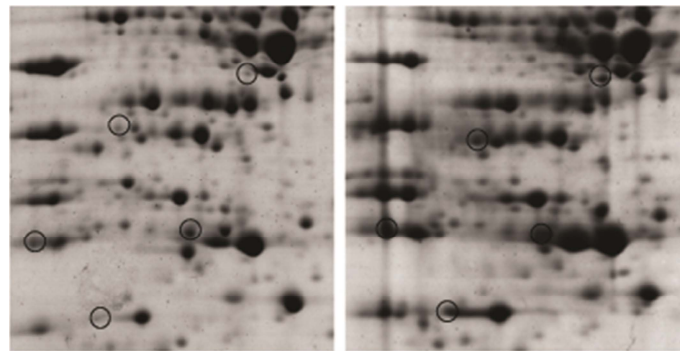


图3 γ -射线辐照后表达量增加的抗氧化酶类(局部放大图)
未辐照(a); 辐照后(b); 从左至右: 蛋白点 1201, 2105, 2308, 3202, 5406
Fig.3 Zoomed view of antioxidation enzymes enhanced by γ -ray irradiation
(a) non-irradiated; (b) irradiated; from left to right: Spot 1201, 2105, 2308, 3202 and 5406

辐射后细胞除抵抗氧化胁迫外, 还需要修复 DNA 损伤。本研究发现 5 种参与核苷酸代谢的酶类在辐照后上调, 包括磷酸核糖甲酰甘氨酸合酶(蛋白点 2302)、丝氨酸羟甲基转移酶(蛋白点 7607 和 8601)、前咕啉-8X 甲基变位酶(蛋白点 8203)、腺苷酸激酶(蛋白点 5203)和鸟苷酸激酶(蛋白点 2203 和 4201)。其中丝氨酸羟甲基转移酶和鸟苷酸激酶

分别具有两种亚型, 其分子量相同, 但等电点发生变化, 暗示出辐射过程中可能发生了蛋白质修饰。

辐射后转录和翻译系统也发生了一些变化。转录延伸因子 GreA (蛋白点 1103)、核糖体再循环因子(蛋白点 8101)和多肽脯氨酰顺反异构酶(PPI)亲环蛋白型(蛋白点 6101)在辐射后上调。在 *D.radiodurans* 也观察到转录延伸因子和 PPI 在辐射

后表达量增加^[19,26-27]。触发因子(蛋白点 1802)是 PPI 家族的成员^[28],在辐射后下调。翻译延伸因子 EFTu(蛋白点 2603)也出现下调。但在 *D.radiodurans* 和其它 *Bacillus* 的辐射后恢复生长中, EFTu 是上调表达的^[29-30], 推测 EFTu 在辐射过程中被降解, 但可能在细胞恢复生长中被重新合成。

在蛋白质的降解方面, 研究表明 Clp 蛋白酶(蛋白点 8903)下调, 而肽酶 T(蛋白点 2501)上调, 推测不同类型的蛋白酶可能参与了辐射后受损蛋白质的降解。

无机离子和有机小分子在辐射抗性中的作用日益受到重视。在 *D.radiodurans* 中, Mn(II)-复合物可以清除辐射产生的自由基^[11]。在 *Halobacterium* NRC-1 中, 高浓度的 Br⁻可以增强细胞辐射抗性^[31]。本研究发现, 一种功能未知的蛋白, YrhD-类似蛋白(蛋白点 6101)在辐射后显著上调表达。在巨大芽胞杆菌中, 这一基因两侧是 *modA* (编码钼 ABC 转运蛋白)和 *yrhE*(编码钼氧化还原酶家族蛋白)^[32], 暗示出 YrhD-类似蛋白可能参与钼代谢, 其与辐射抗性的关系尚需进一步研究。

3 结论

芽胞杆菌 T61 是一种具有较强辐射抗性的菌株, 在 10 kGy γ -射线辐射后, 芽胞杆菌 T61 蛋白质组发生了以下变化: (1)多种类型抗氧化酶在辐射后上调, 推测抗氧化保护在 T61 辐射抗性中发挥关键作用; (2)辐射过程中, 细胞主要通过酵解或利用其它代谢物获得能量; (3)核苷酸从头合成途径的上调有利于促进 DNA 的修复; (4)转录和翻译系统的启动以保证受损蛋白质的修复和新蛋白质的再合成。图 4 概括了芽胞杆菌 T61 细胞蛋白质组在 ⁶⁰Co γ -辐射过程中所发生的主要变化。

本研究首次发现醛-酮还原酶在辐射后显著上调。由于醛-酮还原酶超家族可以催化脂类物质过氧化形成的醛类物质的还原, 因而在辐射后的抗氧化保护中发挥重要作用。我们目前正在进行醛-酮还原酶基因缺失突变体的构建和功能分析, 初步研究结果表明醛-酮还原酶基因的缺失可使菌株的辐射抗性降低, 相关生物学功能的分析正在进行中。

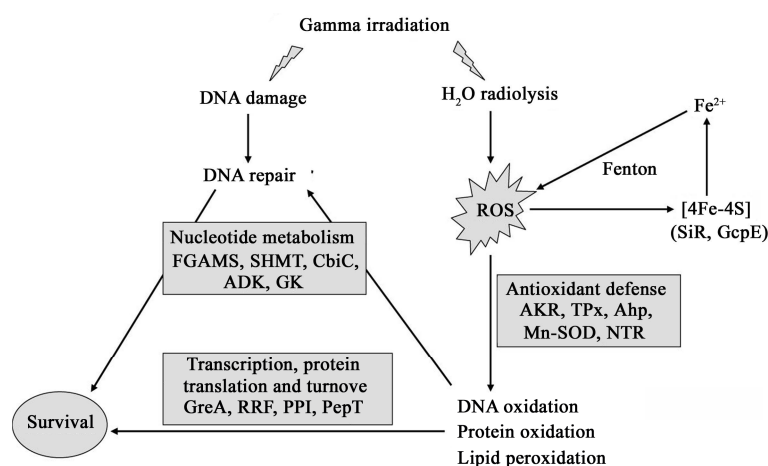


图 4 γ -射线辐照后芽胞杆菌 T61 细胞蛋白质组变化图解

Fig.4 Main change scheme of cellular proteins in *Bacillus* sp. T61 after γ -ray irradiation

AKR: 醛-酮还原酶 Aldo/keto reductase; TPx: 巯基过氧化物酶 Thiol peroxidase; Ahp: 烷基过氧化氢还原酶 Alkyl hydroperoxide reductase; NTR: 硝基还原酶 Nitroreductase; SHMT: 丝氨酸羟甲基转移酶 Serine hydroxymethyltransferase; FGAMS: 磷酸核糖甲酰甘氨酸合酶 Phosphoribosylformylglycinamide synthase; CbiC: 前咕啉-8X 甲基变位酶 Precorrin-8X methylmutase; ADK: 腺苷酸激酶 Adenylate kinase; GK: 鸟苷酸激酶 Guanylate kinase; GreA: 转录延伸因子 GreA transcription elongation factor; RRF: 核糖体再循环因子 Ribosomal recycling factor; PPI: 多肽脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; PepT: 肽酶 T peptidase T; SiR: 亚硫酸还原酶 Sulfite reductase; GcpE: 4-羟基-3-甲基-2-烯-1-基-二磷酸合成酶 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase

致谢 感谢崔素霞教授在蛋白质组学分析方面给予的参考文献建议和指导。感谢北京大学化学与分子工程学院应用化学系钴源室为 ⁶⁰Co γ -射线辐照处理提供的帮助。

- 1 Krisko A, Radman M. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans* [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013, 5(7):

- a012765.
- 2 Cox M M, Battista J R. *Deinococcus radiodurans*-the consummate survivor [J]. Nature Review Microbiology, 2005, **3**(11): 882-892.
- 3 Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, **75**(1): 133-191.
- 4 Misra H S, Rajpurohit Y S, Kota S. Physiological and molecular basis of extreme radioresistance in *Deinococcus radiodurans* [J]. Current Science, 2013, **104** (2): 194-205.
- 5 Luan H, Meng N, Fu J, *et al.* Genome-wide transcriptome and antioxidant analyses on gamma-irradiated phases of *Deinococcus radiodurans* R1 [J]. PLoS One, 2014, **9**(1): e85649.
- 6 Zahradka K, Slade D, Bailone A, *et al.* Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans* [J]. Nature, 2006, **443**(7111): 569-573.
- 7 Slade D, Lindner A B, Paul G, *et al.* Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans* [J]. Cell, 2009, **136**(6): 1044-1055.
- 8 de la Tour C B, Passot F M, Toueille M *et al.* Comparative proteomics reveals key proteins recruited at the nucleoid of *Deinococcus* after irradiation-induced DNA damage [J]. Proteomics, 2013, **13**(23-24): 3457-3469.
- 9 Daly M J. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans* [J]. Nature Review Microbiology, 2009, **7**(3):237-245.
- 10 Daly MJ. Death by protein damage in irradiated cells [J]. DNA Repair, 2012, **11**(1):12-21.
- 11 Culotta V C, Daly M J. Manganese complexes: diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, **19**(9): 933-944.
- 12 Kotiranta A K, Ito H, Haapasalo M P, *et al.* Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, **179**(2): 275-280.
- 13 Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, *et al.* Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation [J]. Journal of Bacteriology, 2007, **189**(8): 3306-3311.
- 14 Granger A C, Gaidamakova E K, Matrosova V Y, *et al.* Effects of Mn and Fe levels on *Bacillus subtilis* spore resistance and effects of Mn²⁺, other divalent cations, orthophosphate, and dipicolinic acid on protein resistance to ionizing radiation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, **77**(1): 32-40.
- 15 Ghosh S, Ramirez-Peralta A, Gaidamakova E, *et al.* Effects of Mn levels on resistance of *Bacillus megaterium* spores to heat, radiation and hydrogen peroxide [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, **111**(3): 663-670.
- 16 Gupta A K, Pathak R, Singh B, *et al.* Proteomic analysis of global changes in protein expression during exposure of gamma radiation in *Bacillus* sp HKG 112 isolated from saline soil [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, **21**(6): 574-581.
- 17 Yazdani M, Naderi-Manesh H, Khajeh K, *et al.* Isolation and characterization of a novel gamma-radiation-resistant bacterium from hot spring in Iran [J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, **49**(1): 119-127.
- 18 Yazdani M, Naderi-Manesh H. Comparative proteomics analysis of a novel γ -radiation-resistant bacterium wild-type *Bacillus megaterium* strain WHO DQ973298 recovering from 5 kGy γ -irradiation [J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2012, **10**(2): 96-105.
- 19 Basu B, Apte S K. Gamma radiation induced proteome of *D radiodurans* primarily targets DNA repair and oxidative stress alleviation [J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2012, **11**(1): M111. 011734
- 20 Mindnich R D, Penning T M. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily, genomics and annotation [J]. Human Genomics, 2009, **3**(4): 362-370.
- 21 Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, *et al.* Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen Species generation [J]. Science, 2003, **299**(5607): 700-704.
- 22 Crane B R, Siegel L M, Getzoff E D. Structures of the siroheme- and Fe₄S₄-containing active center of sulfite reductase in different states of oxidation, heme activation via reduction-gated exogenous ligand exchange [J]. Biochemistry, 1997, **36**(40): 12101-12119.
- 23 Rivasseau C, Seemann M, Boisson A M, *et al.* Accumulation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in illuminated plant leaves at supraoptimal temperatures reveals a bottleneck of the prokaryotic methylerythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. Plant, Cell & Environment, 2009, **32**(1): 82-92.

- 24 Veeranagouda Y, Benndorf D, Heipieper H J, *et al.* Purification and characterization of NAD-dependent n-butanol dehydrogenase from solvent-tolerant n-butanol-degrading *Enterobacter* sp VKGH12 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, **18**(4): 663-669.
- 25 McCool G J, Cannon M C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium* [J]. Journal of Bacteriology, 2001, **183**(14): 4235-4243.
- 26 Zhang C, Wei J, Zheng Z, *et al.* Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation [J]. Proteomics, 2005, **5**(1): 138-143.
- 27 Lu H, Gao G, Xu G, *et al.* *Deinococcus radiodurans* PprI switches on DNA damage-response and cellular survival networks after radiation damage [J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2009, **8**(3): 481-494.
- 28 Bigot A, Botton E, Dubail I. A homolog of *Bacillus subtilis* trigger factor in *Listeria monocytogenes* is involved in stress tolerance and bacterial virulence [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(10): 6623-6631.
- 29 Tanaka A, Hirano H, Kikuchi M, *et al.* Changes in cellular proteins of *Deinococcus radiodurans* following gamma irradiation [J]. Radiation and Environmental Biophysics, 1996, **35**(2): 95-99.
- 30 Joshi B, Schmid R, Altendorf K, *et al.* Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1 [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2004, **320**(4): 1112-1117.
- 31 Kish A, Kirkali G, Robinson C, *et al.* Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum* NRC-1 [J]. Environmental Microbiology, 2009, **11**(5): 1066-1078.
- 32 Liu L, Li Y, Zhang J, *et al.* Complete genome sequence of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH-002 [J]. Journal of Bacteriology, 2011, **193**(22): 6389-6390.

Radiation resistance of *Bacillus* sp. T61 and analysis of cellular protein changes after gamma-ray irradiation

XUAN Huijuan LI Li BAI Mingyan SUN Yunfeng WAN Ping YANG Zhiwei

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

ABSTRACT The radiation resistance of *Bacillus* sp. T61 and protein changes after exposure to gamma-ray irradiation were assayed by survival evaluation, two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. The results showed that D_{10} value of strain T61 was 10%, much higher than that of radiation sensitive *E.coli* K12. Thirty-four proteins showed significant changes after irradiation of 10 kGy, including crucial components participating in antioxidant defense, nucleotide metabolism, energy production, transcription, and protein translation or turnover. The induction of key components involved in antioxidant defense system strongly suggests that antioxidation protection plays a crucial role in radiation resistance in *Bacillus* sp. T61.

KEYWORDS *Bacillus*, Radiation resistant, Proteomics analysis, Antioxidation protection

CLC Q691, TL71