

耐辐射球菌 *pprI* 基因转染对受照酵母菌抗氧化能力的影响

丛瑛 吴伟 文玲 杨占山

(苏州大学医学部放射医学与防护学院放射毒理教研室 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 研究不同剂量 ^{60}Co γ 射线对转染了耐辐射球菌 *pprI* 基因的毕赤酵母菌过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性的影响, 探讨耐辐射球菌 *pprI* 基因在酵母菌中的表达对辐射细胞抗氧化能力的作用。Western blot 检测酵母菌培养上清液中目的蛋白 PprI 的表达分泌。分别通过可见光法、单胺氧化法、分光光度比色法测定 CAT、SOD 和 GSH-Px 的活性。转染耐辐射球菌 *pprI* 基因的毕赤酵母菌中检测到 PprI 蛋白质的表达。当 γ 射线剂量为 2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy、10 Gy 时, 不论是转基因毕赤酵母组还是对照组, CAT、SOD、GSH-Px 活性均随着剂量的增加出现先升高后降低的趋势, 并且受照后转基因毕赤酵母菌中 3 种酶的活性均显著高于对照组 ($p < 0.01$)。耐辐射球菌 *pprI* 基因在酵母菌中的表达能显著增强辐射细胞的抗氧化能力, 这可能是原核 *pprI* 基因转染增强真核细胞抗辐射能力的机理之一。

关键词 耐辐射球菌 *pprI*, 毕赤酵母, ^{60}Co γ 射线, 过氧化氢酶, 超氧化物歧化酶, 谷胱甘肽过氧化物酶
中图分类号 TL71

耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 是一种对电离辐射、紫外线、强氧化剂和化学诱变剂具有超强耐受力的极端微生物, 是迄今为止发现的对辐射抗性最强的原核生物^[1]。稳定生长期的耐辐射球菌可耐受 15 kGy 的辐射剂量, 是大肠杆菌辐射抗性的 250 多倍^[2,3]。耐辐射球菌经大剂量的 γ 射线照射后能准确无误地修复 150—200 多个 DNA 双链断裂 (DSB) 和上千个单链断裂 (SSB)^[2]。近来研究发现, *pprI* 突变株受照后生存率明显低于正常耐辐射球菌^[4]。耐辐射球菌中的 *pprI* 基因是一个能够促进细胞体内 RecA、PprA 等参与 DNA 损伤修复基因表达的开关基因, 在耐辐射球菌的极端抗性中起重要作用^[5]。

电离辐射对 DNA 的损伤有两种: 一种是直接由射线造成的 DNA 断裂; 另一种是由辐射作用于水产生大量自由基 (有 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 $\text{HO}^{\cdot}$) 而引起 DNA 损伤。因此有人认为^[6], 耐辐射球菌的抗放作用可能与其抗氧自由基的能力有关。为抵抗自由基的损伤, 细胞内会产生能降解自由基的酶并修复因自由基引起的损伤。其中, 细胞通过改进抗氧化防御体系, 利用抗氧化酶有效清除活性氧自由基的方式来避免受氧化损伤, 所以细胞内抗氧化酶的含量和活性高低在相当程度上与生物体的抗辐射能力有

关。在抗氧化系统中, 主要以过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 研究较多。本实验研究不同剂量 ^{60}Co γ 射线对转染了耐辐射球菌 *pprI* 基因的毕赤酵母菌 CAT、SOD、GSH-Px 活性的变化, 迄今尚未见与此相关的报道。本研究阐明 *pprI* 原核基因在真核细胞中的表达对辐射细胞抗氧化系统的影响, 为进一步研究 PprI 蛋白质对真核细胞的生物学效应和抗辐射机制提供实验资料。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 耐辐射球菌 PprI 蛋白的毕赤酵母分泌表达工程菌株由苏州大学放射毒理学教研室吴伟硕士制备提供。

1.1.2 酵母菌培养基 YPD: 2%蛋白胨, 1%酵母提取物, 2%葡萄糖; MD: 1.34%YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 2%葡萄糖; BMMY: 2%蛋白胨, 1%酵母提取物, 1%硫酸铵, 0.34%YNB, 100 mmol/L PBS pH 6.0; BMGY: 2%蛋白胨, 1%酵母提取物, 1%硫酸铵, 0.34%YNB, 100 mmol/L PBS pH 6.0, 1%甘油。

1.1.3 试剂盒 CAT 试剂盒、SOD 试剂盒、GSH-Px

国家自然科学基金项目 (81072236)、国防基础科研资助项目 (A3820060138) 和江苏省高校优势学科建设工程项目 (PAPD) 资助

第一作者: 丛瑛, 女, 1990 年 8 月出生, 2009 年毕业于牡丹江市第一高级中学, 现就读于苏州大学医学部放射医学与防护学院, 放射医学专业, 本科生

通讯作者: 杨占山, E-mail: fd@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2013-04-02, 修回 2013-05-07

试剂盒以及考马斯亮兰蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养 转化的酵母菌和空白对照的酵母菌均先接种于 YPD 固体培养基中, 4℃ 下可保存 3 个月。从 YPD 培养基中挑取单菌落接种于含有 50 mL BMMY 培养基的 500 mL 摇瓶中, 摇床转速为 200 r/min, 28℃–30℃ 培养至菌体 $OD_{600} \approx 20-30$ 。室温离心 4000 r/min, 5 min, 去除上清, 收集细胞, 用 50 mL BMMY 培养基重新悬浮细胞, 在 28℃–30℃ 摇床中继续培养, 每隔 24 h, 向摇瓶中加入甲醇至终浓度为 1% 进行诱导表达。诱导表达第 1 天和第 2 天后取培养上清液进行检测目的蛋白, Western blot 方法检测。

1.2.2 ^{60}Co γ 射线照射 取 1.2.1 培养的两株酵母菌经 4000 r/min 离心 5 min, 用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS pH=7.2) 洗两次, 再用 PBS 调节细菌浓度为 $OD_{600} \approx 20-30$ 。将转化菌和空白菌各分装成 5 份, 每份含 5 mL 菌液, 用 ^{60}Co γ 射线照射, 吸收剂量分别为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy、10 Gy, 每份平行 3 个样品, 重复实验 3 次。

1.2.3 细菌的裂解和细胞上清液的获取 取细菌悬液置于冰上用 Soniprep150 超声仪破碎。将菌液超声 2 min, 间歇 1 min, 共超声 6 min, 超声输出功率为 75 W。超声结束后, 将菌液于 4℃、12000 r/min 离心 30 min, 吸取上清液置于 4℃ 备用。

1.2.4 酶活性和蛋白质浓度的测定 CAT 测定采用可见光法, 使用南京建成生物工程研究所的 CAT 测定试剂盒; SOD 测定采用单胺氧化法, 使用南京建成生物工程研究所的 SOD 测定试剂盒; GSH-Px 测定采用分光光度比色法, 使用南京建成生物工程研究所的 GSH-Px 测试试剂盒。蛋白质含量测定采用 Bradford 法, 使用南京建成生物工程研究所的考马斯亮兰蛋白测定试剂盒。按试剂盒说明书方法操作, 酶活性单位为 U/mg, 蛋白浓度单位为 g/L。

1.2.5 统计分析 结果数据采用 SPSS 统计软件进行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 Western blot 检测酵母菌培养上清液中目的蛋白 PprI 的表达分泌

根据 Western blot 检测方法在第 1、2 泳道加入诱导 2 d 的转基因酵母培养上清液, 在 3 泳道加入诱导 1 d 的转基因酵母培养上清液, 电泳结果如图 1 所示。

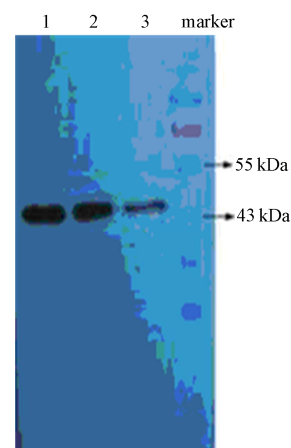


图 1 Western blot 分析 PprI 蛋白在转基因酵母菌中的表达
Fig.1 Western blot analyze PprI protein expression in transgenic yeast

由图 1 可看出, 在转基因酵母中检测到 PprI 蛋白质的表达, 说明构建的质粒能被酵母菌 GS115 识别并成功表达。

2.2 不同剂量照射对酵母菌抗氧化系统酶活性的影响

2.2.1 不同剂量照射对酵母菌 CAT 活性的影响 将各个剂量下对转基因酵母与非转基因酵母中 CAT 活力的测定数值做统计分析, 描绘成曲线如图 2 所示。

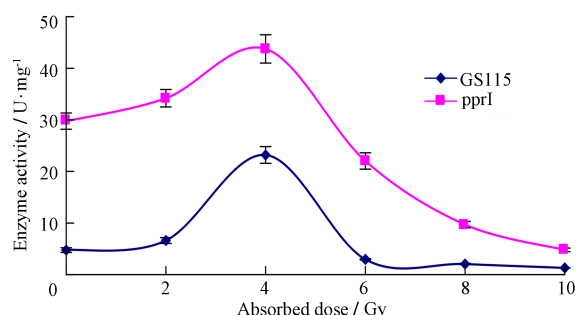


图 2 不同剂量照射后转基因毕赤酵母与非转基因毕赤酵母 CAT 活性变化

Fig.2 The activity change of CAT in transgenic *Pichia pastoris* and non-transgenic *Pichia pastoris* after irradiation of different doses

从图 2 可看出, 0 至 4 Gy 时, 空白 GS115 和转基因 GS115 中过氧化氢酶的活力都逐渐升高, 且在 4 Gy 时达到顶峰, 之后两菌 CAT 活力均下降。在 10 Gy 时趋近于 0。各剂量点中转基因 GS115 的 CAT 活力均要高于空白 GS115, 且具有显著统计学差异 ($p < 0.01$)。

2.2.2 不同剂量照射对酵母菌 SOD 活性的影响 将各个剂量下对转基因酵母与非转基因酵母中 SOD 活力的测定数值做统计分析, 描绘成曲线如图 3 所示。

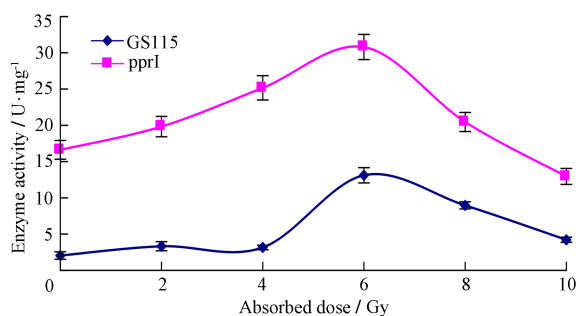


图3 不同剂量照射后转基因毕赤酵母酵母与非转基因毕赤酵母 SOD 活性变化

Fig.3 The activity change of SOD in transgenic *Pichia pastoris* and non-transgenic *Pichia pastoris* after irradiation of different doses

从图3可看出, 0 Gy至6 Gy时, 空白GS115和转基因GS115中SOD活力缓慢升高, 并在6 Gy达最高, 而后, 逐渐降低, 10 Gy时趋于0。各剂量点中转基因GS115的SOD活力均要高于空白GS115, 且具有显著统计学差异 ($p < 0.01$)。

2.2.3 不同剂量照射对酵母菌GSH-Px活性的影响
将各个剂量下对转基因酵母与非转基因酵母中GSH-Px活力的测定数值做统计分析, 描绘成曲线如图4所示。

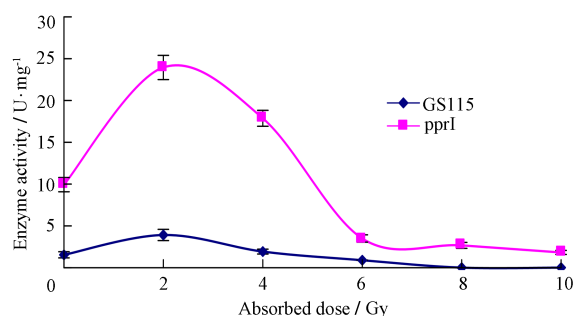


图4 不同剂量照射后转基因毕赤酵母酵母与非转基因毕赤酵母 GSH-Px 活性变化

Fig.4 The activity change of GSH-Px in transgenic *Pichia pastoris* and non-transgenic *Pichia pastoris* after irradiation of different doses

从图4可看出, 在转基因GS115中, 0至2 Gy时, GSH-Px活力上升, 在2 Gy时达到最高值, 之后逐渐下降。在空白的毕赤酵母菌中, 0 Gy至2 Gy时, GSH-Px活力略有升高, 之后逐渐下降, 在6 Gy之后几乎接近于零。各剂量中转基因GS115的GSH-Px活力均要高于空白GS115, 且具有显著统计学差异 ($p < 0.01$)。

3 讨论

PprI是耐辐射球菌中与DNA损伤修复有关的特异性蛋白质。在NCBI基因组数据库中并未发现具有较高同源性的类似物, 但分析已预测的结构域

得知, ppri 含有两个结构域: 一个锌依存性的蛋白酶和一个HTH (Helix turn helix) 结构域, 前者具有蛋白水解酶活性后者具有DNA结合活性。DNA结合活性是耐辐射球菌PprI蛋白抗辐射损伤功能的必要条件^[7]。因此, 推测这一外源基因在毕赤酵母菌中的表达可能在蛋白质水平同样会发挥部分功能, 本实验从PprI在抗氧化方面进一步证实这一推测。以往研究证明, 耐辐射球菌能够高效的修复DNA链的断裂。然而, 间接作用在电离辐射生物学效应的发生上占有十分重要的地位。因此, 从自由基的角度研究耐辐射球菌ppri的抗氧化能力就显得尤为重要。本实验对转化了ppri的毕赤酵母抗氧化系统中3种酶活性的研究发现, 其值均明显高于没有转化ppri的空白对照毕赤酵母菌, 再一次证明ppri在真核细胞中的表达显著增强细胞抗氧化能力。

CAT是以过氧化氢为底物, 通过催化一对电子的转移而最终将其分解为水和氧气。TIAN等^[8]研究表明, 耐辐射奇球菌ppri (Dr0167) 基因突变对菌体活性氧清除作用具有显著影响, 缺失ppri的大肠杆菌突变株对活性氧自由基氧化异常敏感, CAT活性显著降低。而本实验证实该ppri基因在毕赤酵母真核细胞中的表达发挥了重要的抗氧化作用。SOD以分解超氧根离子达到抗氧化效果。美国的Daly等^[9]已研究发现耐辐射球菌能够富集Mn(II)离子, 并且和辐射抗性有着密切的关系, 而SOD的金属辅基Mn(II)是菌体中Mn的主要存在形式之一。可见, 耐辐射球菌能显著增强SOD活性, 提高抗氧化能力。本实验提取耐辐射球菌ppri基因在毕赤酵母中的表达看出SOD酶活性同样升高, 在真核生物中证实这一观点。GSH-Px可使H₂O₂转变为H₂O, 但它主要是使生物体内几乎所有的有机氢过氧化物(R-OOH)还原为R-OH。GSH-Px清除有机氢过氧化物的作用可降低致突发生率, 可延缓细胞老化, 在细胞抗氧化方面有重要意义。从本实验数据结果可以看出, 转基因酵母受照后其GSH-Px含量明显高于空白对照组毕赤酵母, 进而可以说明ppri可以升高受照细胞GSH-Px活性, 增强细胞抗氧化能力。有关耐辐射球菌ppri对GSH-Px的研究较少, 其具体的影响机制有待进一步研究。

由不同剂量对3种抗氧化酶活力影响的分析中可以发现, CAT在4 Gy时达顶峰, SOD在6 Gy时达最大, 而GSH-Px在2 Gy时最高。因此, 可以推测细胞在受到2 Gy、4 Gy、6 Gy时分别主要以分泌GSH-Px、CAT、SOD来抵抗氧化压力。原因可能是SOD将O₂^{·-}转化为H₂O₂, 而转化的H₂O₂最终还是需要CAT来清除, 所以CAT的抗辐射剂量要高

于 SOD。细胞在受低剂量照射时首先产生有机氢过氧化物, GSH-Px 可以使 H_2O_2 转化为 H_2O , 但更重要的是使生物体内几乎所有有机氢过氧化物还原, 因此低剂量是 GSH-Px 分泌的最大值。在对 3 种抗氧化酶的活力测定值中可以看出, CAT 的数值最大, 活性最高, 其次为 SOD 和 GSH-Px, 推测 CAT 在耐辐射球菌 pprI 的辐射抵抗能力中可能比 SOD 和 GSH-Px 起着更加重要的作用。

参考文献

- 1 Minton K W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* [J]. *Mol Microbiol*, 2005, **13**(1): 9-15
- 2 Cox M M, Battista J R. *Deinococcus radiodurans*-the consummate survivor [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(11): 882-892
- 3 BLasius M, Sommer S, HÜbscher U. *Deinococcus radiodurans*: What belongs to the survival Kit [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, **43**(3): 221-238
- 4 Lim S, Song D, Joe, M, *et al.* Development of a qualitative dose indicator for γ -radiation using lyophilized *deinococcus* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, **22**(9): 1296-1300
- 5 Lu H M, Gao G J, Xu G Z J, *et al.* *Deinococcus radiodurans* PprI switches on dna damage response and cellular survival networks after radiation damage [J]. *Mol Cell Prot*, 2009, **8**(3): 481-494
- 6 Chou F I, Tan S T. Manganese (O) induces cell division and increase in superoxide dismutase and catalase activities in an aging *Deinococcus* culture [J]. *J Bacteriol*, 1990, **172**(4): 2029-2035
- 7 Lu H, Chen H, Xu G, *et al.* DNA binding is essential for PprI function in response to radiation damage in *Deinococcus radiodurans* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2012, **11**(2): 139-145
- 8 TIAN Bing, ZHANG Shaowen, XU Zhenjian, *et al.* Effects of PprI and rex on antioxidant activity of *deinococcus radiodurans* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2006, **46**(2): 238-242
- 9 Daly M J, Gaidamakova E K, Matrosova V Y, *et al.* Accumulation of Mn (II) in *deinococcus radiodurans* facilitates γ -radiation resistance [J]. *Science*, 2004, **306**(5): 1025- 1028

Effect of antioxidant capacity on irradiated *Pichia pastoris* by the transfection of *Deinococcus radiodurans* pprI gene

CONY Ying WU Wei WEN Ling YANG Zhanshan

(Department of Radioxicology, School of Radiation Medicine & Protection, Soochow University, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The activity effect of catalase (CAT), the superoxide dismutase (SOD) and the glutathione peroxidase (GSH-Px) of *Pichia pastoris* transfected by *Deinococcus radiodurans* pprI gene in different doses of ^{60}Co γ -ray are studies. The role of *Deinococcus radiodurans* pprI gene expression in *Pichia pastoris* on the antioxidant ability of irradiated cells. The target protein secretion in the culture supernatant of *Pichia pastoris* was verified by Western blot. The activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) was measured by visible absorption spectrometry method, monoamine oxidase method and spectrophotometry colorimetric method, respectively. The expression of PprI protein is detected in the *Deinococcus radiodurans* pprI gene transfected *Pichia pastoris*. The results show that the activities of CAT, SOD and GSH-Px all increase firstly and then decrease with the increasing absorbed doses at range of 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy in both transgenic *Pichia pastoris* and control groups. And after irradiation, the activities of these three enzymes in transgenic *Pichia pastoris* are significantly higher than that in the control group ($p < 0.01$). The expression of *Deinococcus radiodurans* pprI gene in *Pichia pastoris* can obviously increase the antioxidant ability of irradiated cells, which may be one of the mechanisms that prokaryotic pprI gene transfection enhances the radioresistance ability of eukaryotic cells.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans* pprI, *Pichia pastoris*, ^{60}Co γ -ray, Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-Px)

CLC TL71