

# 枯草芽孢杆菌耐辐射菌株对紫外线的耐受性及其机理初探

周莉薇<sup>1</sup> 陈晓明<sup>1</sup> 张建国<sup>1</sup> 柳芳<sup>1</sup> 张根发<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621010)

<sup>2</sup> (北京师范大学生命科学学院 北京 100875)

**摘要** 为探讨枯草芽孢杆菌对紫外线的耐受性,以枯草芽孢杆菌耐辐射菌株及其来源菌株枯草芽孢杆菌黑色变种为研究材料,以不同剂量紫外线辐照处理。采用平板计数法比较两种菌株的存活率,通过脉冲场凝胶电泳分析两种菌的DNA双链断裂(Double strand breaks, DSBs)。发现,对数期耐辐射菌株对紫外线的耐受性明显大于原菌株,耐辐射菌株DSBs水平小于对应的原菌样品。耐辐射菌株对紫外线的耐受性较强,其DNA双链断裂程度与辐照剂量及辐照样品密切相关。

**关键词** 紫外线辐照, 枯草芽孢杆菌, DNA双链断裂, 菌体存活率

**中图分类号** Q682, Q345+.24, Q527+.4, Q939.124

枯草芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌,它可忍受各种不良环境,对热、紫外线、电离辐射和某些化学药品有很强抗性,在医药卫生监测中常常被作为热力、高压、电离灭菌的指示菌,且在基因克隆、工业发酵以及农业畜牧等方面均有一定的运用。1997年枯草芽孢杆菌*B.subtilis* 168已完成了全基因组的测序。本研究室前期开展中子辐照枯草芽孢杆菌黑色变种时,筛选得到一株辐照抗性菌株,将其命名为耐辐射枯草芽孢杆菌株。通过研究发现,此辐照耐受菌株不仅对中子辐照有耐受性,对X射线也有一定的耐受能力(另文报道),在本研究中考察了此耐受菌株对紫外线的耐受能力,并对其耐受机制进行了初探。

从辐照到产生一系列生物学效应过程中,DNA作为损伤的主要靶点,它的损伤是启动一系列生物学效应的关键。因此,对辐照后DNA损伤的研究显得极其重要,其中非修复性的DNA双链断裂(DNA Double Strand Breaks, DSBs)是辐射所致生物效应中最重要的原初损伤<sup>[1]</sup>。长期以来,紫外线诱导的DNA损伤研究主要集中在胸腺嘧啶二聚体的生成上,在研究中发现,紫外线也能诱导DSBs的生成。因此对DSBs的研究有利于进一步了解紫外线辐照效应,也有利于探讨紫外诱发的后期生物学效应。

本研究应用脉冲场凝胶电泳技术<sup>[2-5]</sup>,对紫外

线<sup>[6]</sup>照射下的枯草芽孢杆菌耐辐射菌株及其来源菌株枯草芽孢杆菌原菌进行分析,以辐照后两种菌体的存活率,及其不同形式样品辐照后DNA双链断裂水平,来分析耐辐射菌株的紫外线耐受性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

枯草芽孢杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*), ATCC 9372, 购于中国普通微生物菌种保藏中心,文中用原菌表示。本研究室通过中子辐照后筛选出的具有辐照抗性的枯草芽孢杆菌耐辐射变种一株,文中用耐辐射菌株表示。

### 1.2 样品制备

1.2.1 菌悬液样品制备 营养琼脂培养基(NA固体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,琼脂糖 25 g,水 1000 mL)培养耐辐射菌株及原菌,37℃分别培养48 h及10 d后收集菌体于0.03 mol/L pH 7.2 PBS(无水磷酸氢二钠 2.83 g,磷酸二氢钾 1.36 g,蒸馏水 1000 mL),分别标记为耐辐射菌株对数期样品,原菌对数期样品,耐辐射菌株芽孢样品及原菌芽孢样品。芽孢样品振荡均匀后置于45℃的水浴中自溶断链24 h,80℃水浴中灭活20 min,冷却至室温后保存于4℃。

西南科技大学核废物与环境安全国防重点学科实验室基金项目(07JGZB07)、中国工程物理研究院预研基金资助(052056)、中物院核物理与化学研究所资金(07zh0132)资助

第一作者:周莉薇,女,1983年1月出生,2005年毕业于西南科技大学,植物学硕士

通讯联系人:张根发

收稿日期:初稿 2009-01-13,修回 2009-02-26

1.2.2 胶块样品制备 两种菌株对数期样品 4500 r/min×10 min 离心收集菌体, PBS 洗涤一次后将菌体复溶于无菌水。

1.2.3 菌体样品制备 在 10 mm×10 mm 方格盒中, 加入 300 μL 菌悬液与等体积 2% 低熔点琼脂糖, 混匀, 加盖后置于 4 °C 冰箱中 30 min 后取出。每个胶块中加入 600 μL PBS 缓冲液保存于 4 °C, 分别定义为耐辐射菌株菌体样品及原菌菌体样品。

1.2.4 DNA 样品制备 将菌株悬液按上述方法做成胶块后, 参照文献[1]对样品进行裂解处理, 分别定义为耐辐射菌株 DNA 样品及原菌 DNA 样品。

### 1.3 辐照处理

将菌株悬液样品加入无菌方格盒正中两排格子中, 每个格子中加入 2 mL 菌株悬液, 辐照时方格盒不加盖。将胶块样品置于无菌平皿中, 所有样品辐照过程中均置于紫外灯正下方, 并与紫外灯管保持平行。

辐照时采用 30 W 紫外灯 (购于南京紫光电器有限公司), 波长 254 nm, 距紫外灯垂直距离 40 cm、30 cm、20 cm、10 cm、5 cm 处辐照 3 h, 利用紫外辐射计 (UVM, 北京师范大学仪器厂) 进行紫外光强度测定, 得到对应的辐照剂量分别为: 10.1、17.8、35.0、72.7、164.2 J/cm<sup>2</sup>。辐照完毕后立即对菌体样品胶块进行裂解处理, 方法同前。每个样品 3 个重复。所有辐照操作均在暗室中进行。

### 1.4 辐照后样品处理

(1) 将辐射后的菌悬液倍比稀释后取 100 μL 涂平板, 每个稀释度 3 个重复, 37 °C 培养 48 h 后计数。

(2) 菌体样品辐照完毕后立即进行裂解处理, 方法同 DNA 样品制备。将胶块去除四周后切割成 5 mm×5 mm, 粘在梳齿的外侧, 晾干后将梳子竖立置于电泳槽中。0.5×TBE 制备 1% 琼脂糖凝胶, 灌胶, 待凝固后放入脉冲场凝胶电泳槽, 加入 0.5×TBE 缓冲液进行电泳。电泳条件 6 V/cm, 脉冲角度 120°, 温度 14 °C, 时间 16h。标准 DNA 采用 λ DNA 梯度 0.05~1 Mb (美国 Bio-rad 伯乐公司)。

### 1.5 数据处理

(1) 利用 Origin 7.5 对各样品菌株存活率与辐照剂量之间的关系进行分析作图, 结合 SPSS10.0 对所得数据进行统计回归, 拟合方程求取 D<sub>10</sub> 值, 分析四种样品对辐照的耐受性。

(2) 电泳后的凝胶样品放入 5 μg/mL 溴化乙锭溶液中染色 30 min, 然后在 Geldoc 图像仪上照相观察

图谱。用 Quantity one 软件分析各泳道 DNA 荧光强度, 将泳道中已移出加样孔的 DNA 荧光强度所占该泳道中总 DNA 荧光强度的比值定义为各泳道中 DNA 的释放百分比 PR 值。采用平均分子量法<sup>[7]</sup>计算 DNA 断裂水平 L, 公式(1)中 PR 值为各辐照剂量下的 PR 值与对照 PR 值的差值:

$$L = \left[ \frac{X \times PR}{T} - m \right] \div X = \frac{PR}{T} - \frac{m}{X} \approx \frac{PR}{T} \quad (1)$$

式中, m 为细胞中线状双链 DNA 分子的条数, X 为 DNA 分子的总长 (Mbp), PR 为辐照后产生的 DNA 片段释放百分比, T 为 DSB 片段加权平均分子量 (Mbp)。

利用 Origin 7.5 对 PR 值及 L 值与辐照剂量之间的关系进行分析作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 辐照后菌体存活率比较

图 1 表示紫外线辐照后样品的存活率对数值随辐照剂量的变化。可以看出随着辐照剂量的增加, 四种样品的存活率对数值减少, 芽孢样品存活率明显大于对数期样品。对数期样品中耐辐射株存活率明显大于原菌, 特别是在剂量为 72.7 J/cm<sup>2</sup> 和 164.2 J/cm<sup>2</sup> 时, 两种菌的差异更大 (p<0.05), 但两种芽孢样品存活率差异不大。

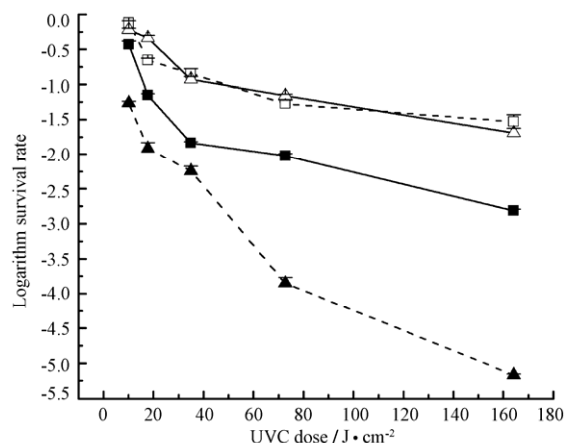


Fig.1 The survival curves of the four samples after ultraviolet irradiation ( $n=60$ ,  $p<0.05$ )  
 ■ Radiation-resistant strain log phase samples  
 □ Radiation-resistant strain spore samples  
 ▲ Original strain log phase samples  
 △ Original strain spore samples

利用 SPSS10.0 对四种样品进行数据统计, 得到回归方程分别是: (1) 耐辐射株对数期样品  $y=1.257-0.802 \cdot \ln x$ ,  $R^2=0.963$ ,  $p<0.05$ , 其中 y 为存

活率的对数,  $x$  为紫外线辐照剂量 ( $J/cm^2$ ), 以下同。当存活率为 10% 时  $y = -1$ , 将此时的  $x$  值记为  $D_{10}$ ,  $(D_{10})_1 = 16.68 J/cm^2$ 。(2) 原菌对数期样品  $y = 2.221 - 1.409 \cdot \ln x$ ,  $R^2 = 0.961$ ,  $p < 0.05$ ,  $(D_{10})_2 = 9.84 J/cm^2$ 。(3) 耐辐射株芽孢样品  $y = 0.89 - 0.489 \cdot \ln x$ ,  $R^2 = 0.964$ ,  $p < 0.05$ ,  $(D_{10})_3 = 47.70 J/cm^2$ 。(4) 原菌芽孢样品,  $y = 1.098 - 0.542 \cdot \ln x$ ,  $R^2 = 0.977$ ,  $p < 0.05$ ,  $(D_{10})_4 = 47.98 J/cm^2$ 。

### 2.2 DNA 断裂水平比较

图 2 是四种样品经 16 h 脉冲场凝胶电泳图, 从

左至右依次是原菌 DNA 样品、原菌菌体样品、耐辐射菌株 DNA 样品、耐辐射株菌体样品。根据图 2 中条带的荧光强度分析四种样品释放百分比  $PR$  值随辐照剂量的变化见图 3。可以看出, 随着辐照剂量的增大, 耐辐射菌株两个样品的  $PR$  值先递增后递减, 而原菌两样品  $PR$  值逐渐递增。另外, 辐照后原菌菌体样品的  $PR$  最大值出现在  $72.7 J/cm^2$ , 辐照后耐辐射菌 DNA 样品的最小  $PR$  值为  $10.1 J/cm^2$ 。在相同辐照剂量下, 总体上原菌样品  $PR$  值大于对应的耐辐射菌样品, 而在同种菌中, 菌体样品  $PR$  值大于其 DNA 样品值。

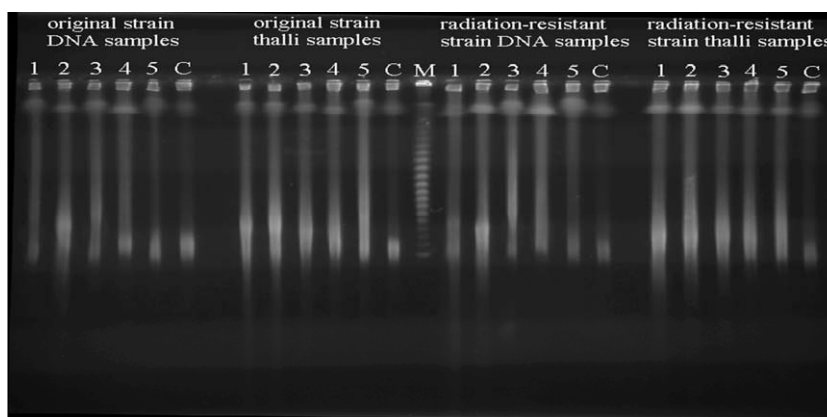


Fig.2 The PFGE picture of the four samples

Note: 1:  $164.2 J/cm^2$ , 2:  $72.7 J/cm^2$ , 3:  $35.0 J/cm^2$ , 4:  $17.8 J/cm^2$ , 5:  $10.1 J/cm^2$ , C: control, M-marker

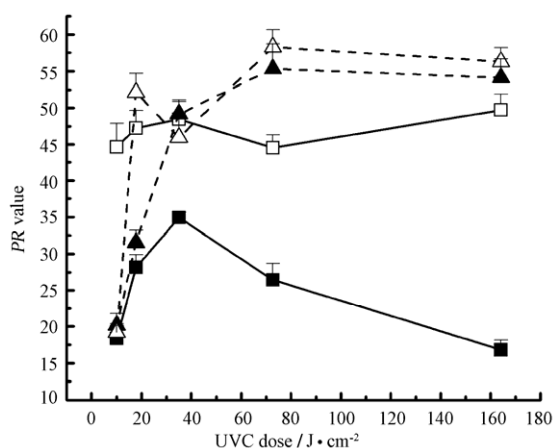


Fig.3 The PR value of the four samples after irradiation for 16 h electrophoresis time ( $n=60$ ,  $p < 0.05$ )

- Radiation-resistant strain DNA samples
- Radiation-resistant strain thalli samples
- ▲ Original strain DNA samples
- △ Original strain thalli samples

### 2.3 辐照后 DNA 断裂产额 $L$ 值比较

辐照后产生的 DNA 断裂产额  $L$  值按公式(1)进行计算。如图 4 所示 16 h 脉冲场凝胶电泳条件下, 相同辐照剂量下耐辐射株两种样品  $L$  值小于对应原

菌样品, 说明耐辐射株 DNA 序列在受到紫外线辐照时损伤较小。同种菌的两种样品中, 菌体样品  $L$  值大于对应的 DNA 样品。另外, 耐辐射菌株两种样品最大  $L$  值出现在辐照剂量为  $35.0 J/cm^2$  处, 原菌 DNA 样品最大  $L$  值出现在辐照剂量为  $72.7 J/cm^2$  处, 其菌体样品最大  $L$  值出现在  $17.8 J/cm^2$  处。

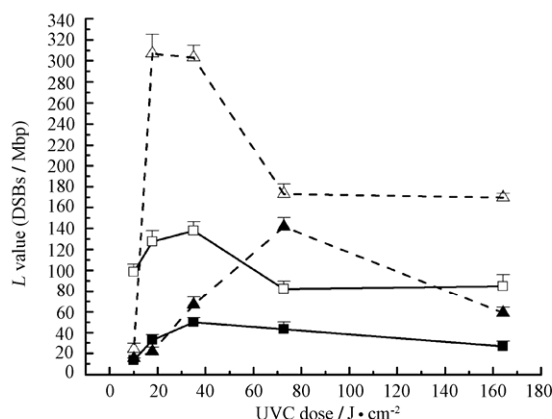


Fig.4 The L value of the four samples after irradiation for 16 h electrophoresis time ( $n=60$ ,  $p < 0.05$ )

- Radiation-resistant strain DNA samples
- Radiation-resistant strain thalli samples
- ▲ Original strain DNA samples
- △ Original strain thalli samples

### 3 结论与讨论

在本研究中, 采用 16 h 脉冲场凝胶电泳, 包埋菌体后进行原位裂解, 成功地分离了 DSBs 片段, 并对其进行了断裂产额的计算。两种菌的存活率及 DSBs 断裂产额的结果表明耐辐射菌株的紫外线耐受性明显高于原菌, 且 DNA 双链断裂程度与辐照剂量及辐照样品种密切相关。

#### 3.1 耐辐射菌株与原菌存活率比较

图 1 中, 对四种样品的存活率对数值进行回归分析, 得到  $D_{10}$  值, 两种对数生长期样品中耐辐射株  $(D_{10})_1=16.68 \text{ J/cm}^2$ , 原菌  $(D_{10})_2=9.84 \text{ J/cm}^2$ ,  $(D_{10})_1 > (D_{10})_2$ ,  $p < 0.05$  表明对数生长期耐辐射菌株的紫外线耐受性强。两种芽孢样品中, 耐辐射菌株  $(D_{10})_3=47.70 \text{ J/cm}^2$ , 原菌  $(D_{10})_4=47.98 \text{ J/cm}^2$ , 两者差异较小, 其对辐照的抗性一致; 芽孢样品  $D_{10}$  明显大于两种对数期样品  $p < 0.05$ , 即芽孢样品对紫外线的抗性大。文献[8]报道了芽孢对紫外线的抗性大于细菌本身的原因: (1) 芽孢的保护机制。(2) 芽孢中 DNA 的光化学特性不同于细菌。(3) DNA 损伤修复的差异。基于以上的协同作用, 芽孢因而具有较强的辐照耐受性。在本实验中, 芽孢样品中芽孢的保护作用成为两种菌对紫外线耐受性的主导因素, 因此出现两种芽孢样品对紫外线的抗性基本相同。

#### 3.2 耐辐射株与原菌 DSBs 水平比较

在相同辐照剂量下, 总体上耐辐射株样品的 DSBs 水平小于对应原菌样品, 结合两种菌辐照后存活率的变化, 表明 DNA 的损伤程度与细菌的存活密切相关。两种菌之间存活率的不同, 归根到底可能是由于不同的 DNA 序列造成的。依据量子物理学, 当辐照能量被 DNA 吸收后, 能量会在 DNA 链上发生传递, 导致键能弱的结构优先断裂, 也就是说在 DNA 的序列上会存在辐照损伤的敏化位点。DNA 序列不同其辐照损伤的敏化位点也不同, 尽管现对辐照损伤的敏化位点<sup>[9,10]</sup>的研究报道不少, 但是具体是何种序列结构还需要更多的深入研究。

#### 3.3 DSBs 与辐照剂量的相关性

图 4 中, 四种样品的 DSBs 产额  $L$  值均随辐照剂量的增大出现先增大后减少的趋势, 耐辐射菌株 DNA 样品以及菌体样品的  $L$  最大值出现在辐照剂量  $35.0 \text{ J/cm}^2$  处, 原菌 DNA 样品和菌体样品最大  $L$  值分别出现在辐照剂量  $72.7 \text{ J/cm}^2$  和  $17.8 \text{ J/cm}^2$ 。可

以看出, DSBs 产额并非随着剂量的增大而增大, 有别于已报道的重离子辐照形成的 DSBs 与辐照剂量成线性相关。这可能是基于紫外辐照与重离子辐照损伤方式不同, 紫外线对 DNA 碱基具有选择性损伤, 因此细胞中的 DNA 和蛋白质能吸收紫外线<sup>[11]</sup>, 成为辐照的靶分子。后者的 LET 效应大得多, 与生物分子相互作用主要导致 DNA 单链和双链的断裂<sup>[12]</sup>。我们认为紫外线辐照时, 小剂量紫外线辐照造成 DNA 碱基损伤和主链的断裂, 而大于临界剂量(形成最大  $L$  值的辐照剂量)时, 造成 DNA 发生双链断裂的同时, 由于大量断裂片段 DNA 自由基的复合, 有可能使 DNA 片段间发生交联, 促使计算中 DNA 平均分子量的增加, 导致 DSBs 断裂产额  $L$  值的减少。

#### 3.4 DSBs 与辐照样品种的相关性

在同种菌的两种样品中, 菌体样品的 DSBs 水平大于 DNA 样品。这可能与细菌本身的损伤修复能力有关, 也可能菌体样品中存在有一定量的水, 而 DNA 样品并没有水, 水在 DNA 的紫外辐射损伤中起到相当大的作用, 加之纯的 DNA 样品不具备修复功能, 这一反常现象还需要进行更深入的研究。

#### 参考文献

- 1 陈晓明, 谭碧生, 郑春, 等. 高能物理与核物理, 2007, **31**(10): 972-977  
CHEN Xiaoming, TAN Bisheng, ZHENG Chun, *et al.* High Energy Physics and Nuclear Physics, 2007, **31**(10): 972-977
- 2 Esposito G, Antonelli F, Belli M, *et al.* Advances in Space Research, 2005, **35**(2): 243-248
- 3 Friedland W, Dingfelder M, Jacob P, *et al.* Radiation Physics and Chemistry, 2005, **72**(2-3): 279-286
- 4 臧黎慧, 魏志勇, 李明, 等. 中国血液流变学杂志, 2005, **15**(2): 193-196  
ZANG Lihui, WEI Zhiyong, LI Ming, *et al.* Chinese Journal of Hemorheology, 2005, **15**(2): 193-196
- 5 王芹, 岳井银, 穆传杰. 天津医药, 2006, **34**(6): 399-401  
WANG Qin, YUE Jingyin, MU Chuanjie. Tianjin Medical Journal, 2006, **34**(6): 399-401
- 6 唐玉龙, 郭周义. 光谱学与光谱分析, 2006, **26**(4): 653-657  
TANG Yulong, GUO Zhouyi. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, **26**(4): 653-657
- 7 周光明, 李文建, 高清祥, 等. 原子核物理评论, 2003, **20**(1): 52-54

- ZHOU Guangming, LI Wenjian, GAO Qingxiang, *et al.* Nucl Phys Rev, 2003, **20**(1): 52-54
- 8 Wayne L N, Andrew C S, Peter S. Mutation Research, 2005, **571**(1-2): 249-264
- 9 Löbrich M, Cooper P K, Rydberg B. Internatl J Rad Biol, 1996, **70**(5): 493-503
- 10 Prise K M, Pinto M, Newman H C, *et al.* Radiation Research, 2001, **156**(5): 572-576
- 11 任建廷, 桑建利. 生物学通报, 2004, **39**(1): 4-6  
REN Jianting, SANG Jianli. Bull Biol, 2004, **39**(1): 4-6
- 12 丰收. 原子核物理评论, 2006, **23**(1): 23-34  
ZHANG Fengshou. Nucl Phys Rev, 2006, **23**(1): 23-34

## The study on ultraviolet tolerance and tolerant mechanism of a *Bacillus subtilis* radiation-resistant strain

ZHOU Liwei<sup>1</sup> ZHANG Genfa<sup>2</sup> CHEN Xiaoming<sup>1</sup> ZHANG Jianguo<sup>1</sup> LIU Fang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

<sup>2</sup> (School of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**ABSTRACT** In order to study the ultraviolet tolerance of a *Bacillus subtilis* radiation-resistant strain, the *Bacillus subtilis* radiation-resistant strain and its original *Bacillus subtilis* var. *niger* were used as the samples, and exposed to ultraviolet with different doses. The survival rate of both strains was investigated by plate counting meanwhile the DNA double strand breaks (DSBs) were analyzed by a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). It has been found that the ultraviolet tolerance is greater in radiation-resistant strain than that in the original strain in log phase. And the DSBs level in radiation-resistant strain is lower than that in the corresponding samples of original strain. However, the DSBs are more intense in thalline samples than that in DNA samples. It has been also indicated that the DSBs level is related closely with the absorbed dose as well as the sample types.

**KEYWORDS** Ultraviolet irradiation, *Bacillus subtilis*, DNA double-strand breaks, Strain survival rate

**CLC** Q682, Q345+.24, Q527+.4, Q939.124