

辐射过程中耐辐射奇球菌蛋白酶变化的检测与分析

周绪斌 邢瑞云 吕 星*

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘 要 采用明胶和酪蛋白底物酶谱法以及荧光酪蛋白底物对紫外线以及 γ -射线辐射后恢复期耐辐射奇球菌 R1 (*Deinococcus radiodurans* R1, DRR1) 的蛋白酶变化进行了检测。结果发现, DRR1 存在高活性大分子量组成性表达蛋白酶, 与 Karlin 等^[16]提出的 DRR1 蛋白酶为预测高表达蛋白(PHX)的设想一致。DRR1 包含大量分子量大于 140kD 的明胶降解酶和分子量大于 120kD 的酪蛋白降解酶, 其中活性最高的 174kD 明胶酶在经 SDS 变性处理后仍有较高活性, 该蛋白酶在 DRR1 受紫外线辐射和电离辐射后恢复期的表达模式存在差异, 在 γ -射线电离辐射过程中以及电离辐射后恢复的晚期活性较高。此外, 还发现一些蛋白酶特异性由辐射所诱导, 表明这些蛋白酶可能参与细胞信号通路中蛋白的顺序降解, 也提示 DRR1 损伤修复过程中细胞内存在一个精确的蛋白酶系统。这些蛋白酶的表达与细胞的营养状态相关。同时对一株由本实验室从北京地区土壤中分离到的杆状耐辐射菌 RR533.2 的明胶和酪蛋白蛋白酶谱进行了测定, 结果发现其蛋白酶谱与 DRR1 相类似。

关键词 耐辐射奇球菌 辐射抗性 蛋白酶 酶谱

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0264-06

奇球菌科(Deinococcaceae)细菌为一类无致病性、不形成芽胞、易于培养的独特类群^[1,2]。该类细菌分布广泛, 起源古老。目前奇球菌科中只定义了奇球菌属(*Deinococcus*)这一个属。耐辐射奇球菌 R1 (*Deinococcus radiodurans* R1, DRR1) 是该属中第一个鉴定菌株, 1956 年从经 X-射线照射后仍然腐烂的罐头中分离到^[3], 此后又从不同地区陆续鉴定了奇球菌属的七个菌株^[1,4]。我们实验室也在国内首次从北京地区分离到一株杆状的耐辐射菌-RR533.2, 初步的鉴定结果将其归于奇球菌科^[5]。

DRR1 最为显著的特性是具备超强的电离辐射抗性。它可以在超过 1500 krads 急性电离辐射条件下存活并且不产生变异, 该剂量的电离辐射通常在每个单倍体基因组中形成 100~200 个双链断裂位点(DSB)^[6], 此外, 大剂量的慢性电离辐射(6000rad/h)^[7,8]也不影响细菌的生长以及外源基因的表达^[9]。DRR1 还对紫外线、氧化剂以及干燥等损伤因素具有很强的抵抗力^[2,10,11]。这种特性使得很多学者尝试利用工程化 DRR1 表达金属解毒或者有机物降解基因, 从而达到治理放射性废弃物的目的^[7,8]。DRR1 全基因组测序于 1999 年完成, 基因组分析结果显示该菌表达几乎所有主要原核生物参与

DNA 修复的蛋白^[12]。最近, 学者们也试图通过大规模、高通量的蛋白质表达谱^[13]以及转录谱分析^[14]来探询其超强辐射抗性的机理。然而, 最终了解其超强辐射耐受性的机理还需要大量而细致的研究工作^[15]。

Karlin 和 Mrázek 将与表达基因平均密码子使用偏爱性相差较大, 同时又与核糖体基因密码子偏性相类似的基因定义为预测高表达基因(Predicted highly expressed gene, PHX), 通过生物信息学方法比较 DRR1 和目前全序列已知的原核生物基因组, 结果发现 DRR1 PHX 中, 蛋白酶以及解毒蛋白数量最多, 并且指出这些 PHX 蛋白酶可能在 DRR1 的辐射抗性中发挥特定的功能^[16]。但是, 目前尚未有实验对 DRR1 的蛋白酶表达进行分析的报道, 我们采用明胶和酪蛋白酶谱法以及荧光标记底物对辐射过程中 DRR1 的蛋白酶表达进行了检测与分析, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及其培养条件 野生型耐辐射奇球菌 DRR1(AS1.633)以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)K12

基金项目 军事医学科学院创新基金

* 通讯作者。Tel: 86-10-66932210; Fax: 86-10-68214653; E-mail: lvx@nic.bmi.ac.cn

作者简介 周绪斌(1972-)男, 安徽省太湖县人, 助理研究员, 博士, 主要研究方向为耐辐射奇球菌辐射抗性机理及耐辐射菌分离鉴定。

收稿日期 2004-07-14, 修回日期 2004-12-09

(AS1.365)取自中国科学院微生物所微生物资源中心。耐辐射菌 RR533.2 由本室分离^[5]。耐辐射菌接种培养于新鲜 TGY 培养基(0.5% Tryptone/0.3% Yeast extract/0.1% Glucose, pH7.0),按文献[14]方法于 32℃ 振荡培养 24 h 至对数期($OD_{600} = 1.0$), *E. coli* K12 培养于 LB 培养基。

1.1.2 主要试剂:明胶、酪蛋白、蛋白酶荧光检测试剂盒均为 Sigma 公司产品;Bradford 法蛋白浓度检测试剂盒购自上海生工生物工程公司;BCA 法蛋白浓度检测试剂盒购自北京天象邦定公司;中分子量蛋白标准物购自 Pharmacia 公司。其它试剂购自相关公司。

1.2 辐射处理以及细菌可溶蛋白的制备

紫外线辐射:收集处于对数生长期细菌, PBS 洗两遍, 随后用缓冲液悬浮, 然后将细菌转至灭菌的平板, 室温条件下 $600\text{J}/\text{m}^2$ 剂量紫外线照射约 8 min。
 γ -射线辐照:收集处于对数生长期细菌, 新鲜 TGY 培养液或 PBS 缓冲液悬浮, 置于冰上经 15 kGy 剂量 ^{60}Co γ -射线照射。丝裂霉素 C (MMC) 处理:在培养基中加入 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ MMC, 32℃ 处理 5 min。

细菌经辐射处理后, 将其转入新鲜 TGY 培养液, 32℃ 振荡培养, 分别在照射后恢复 0、0.5、1.5、5、9 h 这 5 个时间点取样。对照菌与受照菌放置于相同温度及时间间隔。在相应的时间点收集细菌, PBS 洗两遍, 冰水浴中超声破碎菌体, 4℃ $12000 \times g$ 离心 20 min, 上清贮存于 -80°C 备用, 采用 Bradford 法或 BCA 法测定总蛋白含量。

1.3 SDS-PAGE

细菌可溶性蛋白的 SDS-PAGE 参照文献[17], 采用 8% 分离胶和 5% 积层胶。

1.4 银染法检测总蛋白

细菌蛋白同时采用快速银染法进行检测, 参考文献[18] 操作。

1.5 明胶或酪蛋白底物-SDS-PAGE 测蛋白酶活性

细菌蛋白酶谱分析参照 Ellerbroek 等^[19]介绍的方法。将蛋白样品与等量 $2 \times$ 非变性上样缓冲液混匀, 不经煮沸直接上样于聚合有 $2\text{mg}/\text{mL}$ 明胶或酪蛋白的 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶。电泳结束后, 用 2.5% Triton X-100 溶液漂洗凝胶 2 遍以去除 SDS, 然后将凝胶置于蛋白酶谱孵育缓冲液中(50mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 10mmol/L CaCl_2 , 50mmol/L NaCl, 0.05% Brij35), 37℃ 温育 6h(除图 6 外)或过夜(图 6)。考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色, 观察蛋白酶消化

条带。蛋白条带及蛋白酶降解条带的分子量采用软件 AlphaEase (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California) 参照分子量标准物估算。

为了解变性条件下细菌蛋白酶活性, 蛋白在底物 SDS 凝胶电泳后不经过 2.5% Triton X-100 漂洗, 直接放于孵育缓冲液中温育。

1.6 蛋白酶抑制剂实验

细菌蛋白经底物凝胶电泳解析后, 分别置于含有蛋白酶抑制剂 [PMSF ($2\text{mmol}/\text{L}$), Aprotinin ($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$), Leupeptin ($100\ \mu\text{mol}/\text{L}$), EDTA ($5\text{mmol}/\text{L}$)] 的蛋白酶谱孵育缓冲液中, 温育过夜, 如上染色, 脱色, 观察蛋白酶消化条带。

1.7 蛋白酶的定量检测

细菌中可溶性蛋白中蛋白酶的定量检测采用蛋白酶荧光检测试剂盒, 以 FITC 标记的酪蛋白作为底物。将适量蛋白 ($65 \sim 85\ \mu\text{g}$) 与 FITC-酪蛋白置于 37℃ 暗处温育 1h, 然后加入三氯乙酸 (TCA), 37℃ 暗处继续温育 30min, $10000 \times g$ 离心 10min, 蛋白酶降解荧光底物生成游离荧光小片段不能被 TCA 沉淀而存在于上清中, 取 $2\ \mu\text{L}$ 上清加入 $200\ \mu\text{L}$ 检测缓冲液 (0.5mol/L Tris·HCl, pH8.5), 样品置黑色 96 孔板中, 荧光仪测定荧光强度, 激发和发射波长分别为 485nm 和 535nm, 将样品测量值减去空白对照值即为实际荧光强度。每个样品检测 3 组, 取平均值, 实验重复 3 次, *E. coli* 与 DRR1 荧光强度的统计分析采用成组资料 *t* 检验, DRR1 γ -射线照射后不同时期蛋白酶含量采用单因素方差统计分析, 计算采用 SPSS 软件。

2 结果

2.1 DRR1、RR533.2 和 *E. coli* 可溶性蛋白分析

紫外线和 γ -射线辐照后细菌可溶蛋白的电泳结果分别如图 1-A、B 显示, 在总蛋白上样量相同的条件下, 考马斯亮蓝染色难于检测到 DRR1 和 RR533.2 中分子量范围大于 116kD 的蛋白, 而 *E. coli* K12 可溶性蛋白的检测范围大于耐辐射菌。增加蛋白上样量并采用较为敏感的银染方法(图 1-C), 可以检测到分子量较大的蛋白。从图可以看出, 辐射后不同恢复期的 DRR1 以及未受照菌的大多数蛋白条带都比较保守, DRR1 和 RR533.2 蛋白带型也很类似, 但都与 *E. coli* K12 存在较大的差异。

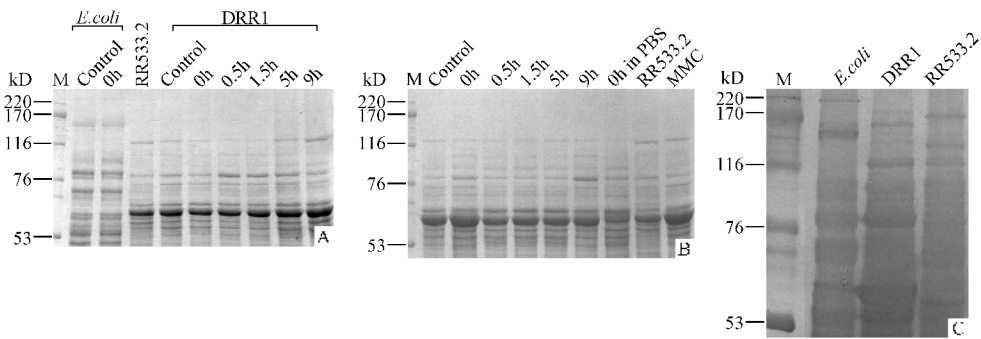


图 1 (A)考马斯亮蓝染色分析紫外线辐射后 DRR1 及 *E. coli* 可溶性蛋白；
 (B)考马斯亮蓝染色分析 γ -射线辐射后 DRR1 可溶性蛋白；
 (C)银染分析 *E. coli* 和耐辐射菌可溶性蛋白

Fig. 1 (A)Analysis of soluble proteins of DRR1 and *E. coli* recovered from UV-irradiation by coomassie blue staining；
 (B)Analysis of soluble proteins of DRR1 recovered from γ -irradiation by coomassie blue staining；
 (C)Analysis of soluble proteins of *E. coli* and radiation-resistant bacterium by silver staining.
 A :10 μ g soluble protein was applied onto each lane. Treatment of each sample was illustrated on the top；
 B :14 μ g soluble protein was applied onto each lane. Treatment of each sample was illustrated on the top.

2.2 明胶和酪蛋白底物酶谱测定 DRR1 蛋白酶的活性

DRR1 经紫外线或 γ -射线辐照后恢复期明胶底物蛋白酶谱结果分别如图 2 显示,耐辐射菌蛋白酶降解明胶底物,从而在凝胶顶部到位于分子量约 140kD 之间形成明亮的负染区带,显示耐辐射菌存在大量的高分子量明胶降解酶。其中可以辨别的最为明显的降解条带分子量约为 174kD 和 140kD(图 2-A、B 中 a 和 b 所示),此外,所有样品中都包括一个酶解活性较弱的 96kD 条带(图 2-A、B 中 c 所示),但在相同的实验条件下,从对照 *E. coli* K12 菌株中未能观察到可见的明胶底物降解条带。对照以及受辐射和 MMC 处理的 DRR1 菌与 RR533.2 明胶酶谱很类似。但是 RR533.2 还存在一个独特的分子量约为 147kD 活性较高的明胶降解酶(图 2-A、B 中 d 所示)。

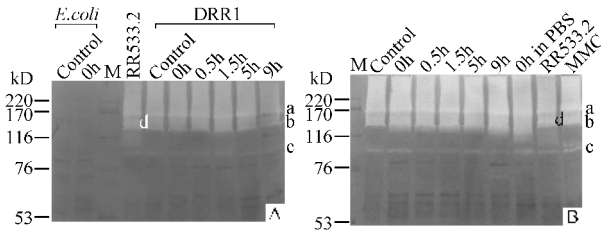


图 2 (A)明胶底物 SDS-PAGE 分析紫外线辐射后 DRR1 及 *E. coli* 蛋白酶谱 (B)明胶底物 SDS-PAGE 分析 γ -射线辐射后 DRR1 蛋白酶谱

Fig. 2 (A)Analysis of zymography of DRR1 and *E. coli* recovered from UV-irradiation by gelatin SDS-PAGE；(B)Analysis of zymography of DRR1 recovered from γ -irradiation by gelatin SDS-PAGE

酪蛋白底物的蛋白酶谱结果如图 3 所示,从 8% 凝胶顶端到分子量约为 120kD 之间形成明亮的酶解负染区带,表明耐辐射菌存在大量高活性的高分子量酪蛋白降解酶。可以分辨的最为明显的降解条带分子量约为 146kD(图 3 中 e 所示),该蛋白酶在所有 DRR1 样品及 RR533.2 都存在。与之对应,未能从 *E. coli* K12 观察到可见的酪蛋白酶解条带。除了上述活性极高的降解区域外,在紫外辐射菌的酪蛋白酶谱图上观察到一条非常清晰的降解条带,分子量约为 74kD(图 3-A 中 f 所示),非常有趣的是,该蛋白酶在未受照菌中存在较弱的活性,辐照后(0h)以及恢复晚期(5~9h)活性较高,但在受辐照后恢复早期(0.5~1.5h)的活性几乎检测不到。

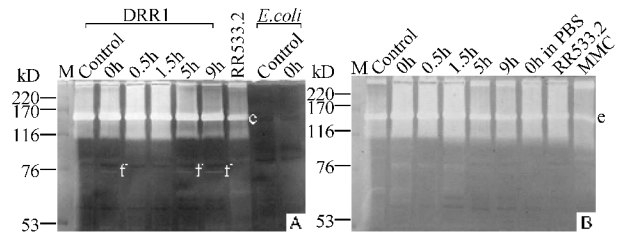


图 3 (A)酪蛋白底物 SDS-PAGE 分析紫外线辐射后 DRR1 及 *E. coli* 蛋白酶谱 (B)酪蛋白底物 SDS-PAGE 分析 γ -射线辐射后 DRR1 蛋白酶谱

Fig. 3 (A)Analysis of zymography of DRR1 and *E. coli* recovered from UV-irradiation by casein SDS-PAGE (B)Analysis of zymography of DRR1 recovered from γ -irradiation by casein SDS-PAGE

2.3 变性条件下 DRR1 蛋白酶活性的检测

细菌可溶蛋白经明胶底物 SDS-PAGE 解析后,未经 Triton X-100 漂洗直接放置于酶谱温育缓冲液中,结果显示活性最高的 174kD 明胶降解酶(图 4 中

a) 在 SDS 变性条件下仍然有活性,同时该蛋白酶活性在细菌受紫外线辐射后随着恢复期的延长而逐渐升高,在照后 9h 最为明显。但是,在 γ -射线照射菌中,该蛋白酶活性在受照射过程中(0h)以及照射后恢复晚期(9h)活性较高,但在恢复期的初始阶段活性较低。受 MMC 处理 DRR1 174kD 明胶降解酶活性明显较高。耐辐射菌 RR533.2 中 174kD 及其特有的 147kD 明胶酶在 SDS 变性条件下都有较高活性。

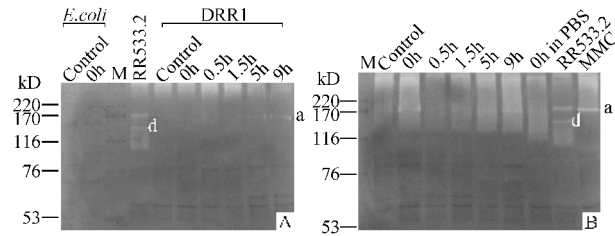


图 4 (A) 明胶底物变性 SDS-PAGE 分析紫外线辐射后 DRR1 及 *E. coli* 蛋白酶谱 (B) 明胶底物变性 SDS-PAGE 分析 γ -射线辐射后 DRR1 蛋白酶谱

Fig. 4 (A) Analysis of zymography of DRR1 and *E. coli* recovered from UV-irradiation by denaturing gelatin SDS-PAGE; (B) Analysis of zymography of DRR1 recovered from γ -irradiation by denaturing gelatin SDS-PAGE

2.4 蛋白酶抑制剂对 DRR1 蛋白酶活性的影响

细菌可溶性蛋白经明胶底物 SDS-PAGE 解析后,分别置于含有不同蛋白酶抑制剂的酶谱孵育缓冲液中,结果发现,除了耐辐射菌 RR533.2 特有的 147kD 明胶降解酶能被 PMSF 所抑制外,其它明胶降解酶活性都不能被蛋白酶抑制剂所抑制。

2.5 FITC-酪蛋白检测细菌蛋白酶活性

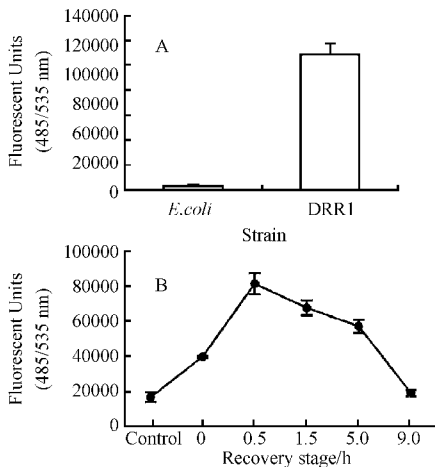


图 5 (A) *E. coli* 和 DRR1 蛋白酶定量测定 (B) DRR1 经 γ -射线辐射后不同恢复时期的蛋白酶活性检测

Fig. 5 (A) The quantified determination of the caseinolytic activity of *E. coli* and DRR1 (B) The quantified determination of the caseinolytic activity of DRR1 recovered from γ -irradiation

以 FITC 标记酪蛋白底物定量检测 DRR1 和 *E. coli* 蛋白酶,结果显示(图 5-A),DRR1 酪蛋白降解酶活性远远高于 *E. coli*,测定的荧光强度约为后者 40 倍 ($P < 0.01$, $0.85 \mu\text{g}$ 蛋白)。 γ -射线辐射后不同恢复时期的酪蛋白降解酶活性,结果显示(图 5-B),DRR1 经电离辐射后,降解酶活性明显升高 ($P < 0.01$, $0.65 \mu\text{g}$ 蛋白),在辐照后 0.5 h 达到最高,然后随着恢复时间延长逐渐恢复到辐照前水平。

3 讨论

通过明胶和酪蛋白底物以及 FITC 标记酪蛋白底物测定耐辐射奇球菌 DRR1 蛋白酶谱及酪蛋白降解酶活性,结果证实,与大肠杆菌相比,耐辐射奇球菌存在超乎寻常高活性的大分子量蛋白酶,这与文献中通过生物信息学方法预测蛋白酶为 DRR1 PHX 蛋白一致^[16]。实际上从总蛋白 SDS-PAGE 分析图上可以看出,高活性蛋白酶蛋白条带只有采用较为敏感的银染方法才能检测到,这也提示了这些高分子量蛋白酶活性非常高。这些蛋白酶很可能在 DRR1 辐射耐受性中发挥某种功能。蛋白酶与辐射敏感的相关性已有报道,例如大肠杆菌 ATP 依赖蛋白酶 ClpYQ 和 Lon 与细菌的紫外辐射敏感性相关^[20],蛋白酶 Lon 降解细胞分裂抑制蛋白 SulA,lon 突变子对紫外辐射敏感,蛋白酶 ClpYQ 与 Lon 有共同的底物,在温度升高时,ClpYQ 降解 SulA 引起细菌对 UV 耐受性增强^[21]。

在微生物基因组中,某些蛋白家族的高度扩增与这些生物适应极端条件下生活相关^[22]。比如奇球菌和分枝杆菌中 a/b 水解酶基因以及奇球菌和枯草杆菌中的枯草杆菌样蛋白酶基因的扩增,蛋白酶基因在奇球菌基因组中的扩增很可能与细菌的应激反应与损伤控制相关,大量的蛋白酶可以参与细菌在应激条件下降解(清除)细胞内受损组分^[22]。众所周之,降解并排出辐射后受损伤的 DNA 是修复机制很重要的组成部分,很显然,这一机制对于受损的蛋白也同样起作用^[23]。我们的实验结果显示,活性最高的 174kD 明胶降解酶和 140kD 酪蛋白降解酶在辐射细菌和对照菌中都同样表达,提示细胞内存在高活性组成性表达蛋白酶,然而通过 SDS 抑制实验以及 FITC 标记酪蛋白检测显示辐照后蛋白酶的活性明显升高,因而很可能这些蛋白酶参与了细胞的修复过程。同时,蛋白酶的这种极高的活性也对于其在细胞受损伤后的氧化性环境中发挥功能非常重要。采用荧光酪蛋白底物检测基质降解酶类活性显

示 DRR1 受电离辐射后 酪蛋白降解酶活性在辐射后明显升高,在约 0.5h 达到最高,然后逐渐降至照射前水平,与明胶酶的动力学过程存在一定差异。这也说明 DRR1 细胞内不同蛋白酶活性在辐射后修复过程中行使不同的功能。

营养条件同样影响辐射后细胞蛋白酶的表达,如图 9 所示,主要的 174kD 蛋白酶在 γ 射线电离辐射后很快升高,然而当受照细菌处于 PBS 中时则活性较低,这表明在最适的生长条件下,细菌更容易对电离辐射发生应激反应^[24]。受丝裂霉素 C 处理细菌 174kD 蛋白酶活性更高,这提示该蛋白酶可能参与由 DNA 损伤剂引起的链间交连。

值得注意的是,除了上述组成性表达的高分子量蛋白酶,在实验中还观察到一些诱导性表达的蛋白酶,图 6 显示的是在孵育缓冲液中温育过夜的结果,这使得我们可以观察到活性较低的蛋白酶。图中 77kD(图 6 中 g)蛋白酶仅仅在 γ -射线电离辐射后恢复期细胞中表达,而在受照射期间及对照细菌中并未观察到,而 68 kD 蛋白酶(图 6 中 h)表达特点则与主要的 174kD 明胶酶活性的动态过程非常类似,即在电离辐射过程中(0h)及恢复晚期(5~9h)活性较高,蛋白酶活性以及表达的这种动态过程的意义我们还不清楚,但很可能这些蛋白酶参与细胞修复过程中底物的有序降解过程。正如 DNA 修复蛋白 RecA 在细胞修复中所起的作用,RecA 对于 DRR1 超强的电离辐射以及其它 DNA 损伤剂的抵抗力至关重要^[25,26]。但是实验证实 RecA 辅助蛋白酶活性比其重组活性在电离辐射耐受过程中起的作用更为明显^[27],而 DRR1 在电离辐射后早期的修复过程是以一种不依赖 RecA 的途径^[28],这也说明了 DRR1 电离辐射损伤修复过程存在着精细而有序的控制。

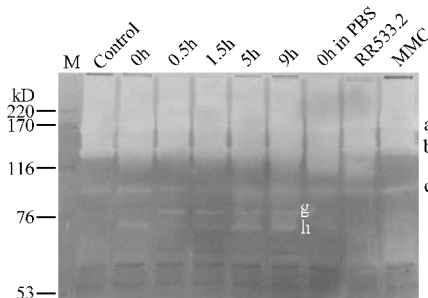


图 6 明胶底物 SDS-PAGE 分析 γ -射线辐射后 DRR1 蛋白酶谱

Fig. 6 Analysis of zymography of DRR1 recovered from γ -irradiation by gelatin SDS-PAGE

After electrophoresis on 8% polyacrylamide gel containing 2mg/mL gelatin, the gel was washed by 2.5% Triton X-100 and developed in zymogram incubation buffer for 12h, stained with Coomassie blue and destained.

实验中发现 RR533.2 与 DRR1 存在着类似的明胶与酪蛋白底物蛋白酶酶谱,这也进一步证实了二者之间的亲缘关系,但是 RR533.2 存在一个独特的高活性 147kD 丝氨酸蛋白酶,说明不同属的细菌之间蛋白酶也存在着较小的差异。

参 考 文 献

- [1] Battista J R, Earl A M, Park M J. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol*, 1999, **7**(9): 362-365.
- [2] Minton K W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol*, 1994, **13**(1): 9-15.
- [3] Anderson A W, Nordan H C, Cain R F, et al. Studies on a radiation resistant micrococcus. I. The isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation. *Food Technol*, 1956, **10**: 575-577.
- [4] Ferreira A C, Nobre M F, Rainey F A, et al. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**(3): 939-947.
- [5] 吕星, 邢瑞云, 周绪斌, 等. 一种短杆状耐辐射菌的分离与鉴定. *微生物学报*, 2003, **43**(3): 301-307.
- [6] Daly M J, Ouyang L, Fuchs P, et al. In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, 1994, **176**(12): 3508-3517.
- [7] Lange C C, Wackett L P, Minton K W, et al. Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(10): 929-933.
- [8] Venkateswaran A, McFarlan S C, Ghosal D, et al. Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2620-2626.
- [9] Brim H, McFarlan S C, Fredrickson J K, et al. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(1): 85-90.
- [10] Moseley B E, Evans D M. Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**(Pt 8): 2437-2445.
- [11] Wang P, Schellhorn H E. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Can J Microbiol*, 1995, **41**(2): 170-176.
- [12] White O, Eisen J A, Heidelberg J F, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 1999, **286**(5444): 1571-1577.
- [13] Lipton M S, Pasa-Tolic L, Anderson G A, et al. Global analysis of the *Deinococcus radiodurans* proteome by using accurate mass tags. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(17): 11049-11054.
- [14] Liu Y, Zhou J, Omelchenko M V, et al. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(7): 4191-4196.

- [15] Narumi I. Unlocking radiation resistance mechanisms : still a long way to go. *Trends Microbiol* , 2003 , **11**(9) : 422 - 425.
- [16] Karlin S , Mrázek J. Predicted highly expressed and putative alien genes of *Deinococcus radiodurans* and implications for resistance to ionizing radiation damage. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2001 , **98**(9) : 5240 - 5245.
- [17] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Now York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [18] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E , et al. *精编分子生物学实验指南*. 颜子颖 , 王海林 , 译. 北京 : 科学出版社 , 1998.
- [19] Ellerbroek S M , Halbleib J M , Benavidez M , et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* , 2001 , **61**(5) : 1855 - 1861.
- [20] Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* , 1996 , **30** : 465 - 506.
- [21] Wu W , Zhou Y , Gottesman S. Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ(HslUV) protease. *J Bacteriol* , 1999 , **181**(12) : 3681 - 3687.
- [22] Makarova K S , Aravind L , Wolf Y I , et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* , 2001 , **65**(1) : 44 - 79.
- [23] Mrázek J. New technology may reveal mechanisms of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99**(17) : 10943 - 10944.
- [24] Daly M J. Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* , 2000 , **11** : 280 - 285.
- [25] Bonacossa de Almeida C , Coste G , Sommer S , et al. Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA , but not LexA , in its regulation. *Mol Genet Genomics* , 2002 , **268**(1) : 28 - 41.
- [26] Gutman P D , Carroll J D , Masters C I , et al. Sequencing , targeted mutagenesis and expression of a recA gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Gene* , 1994 , **141**(1) : 31 - 37.
- [27] Satoh K , Narumi I , Kikuchi M , et al. Characterization of RecA424 and RecA670 proteins from *Deinococcus radiodurans*. *J Biochem (Tokyo)* , 2002 , **131**(1) : 121 - 129.
- [28] Daly M J , Minton K W. An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes recA-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* , 1996 , **178**(15) : 4461 - 4471.

Characterization of the changes in protease of *Deinococcus radiodurans* following irradiation

ZHOU Xu-bin XING Rui-yun LV Xing*

(Beijing Institute of Radiation Medicine , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100850 , China)

Abstract : The activity of protease from *Deinococcus radiodurans* R1(DRR1) recovered from UV light and γ -ray irradiation were characterized by SDS-PAGE zymography or FITC-labeled casein as substrate. It was demonstrated that proteases with large molecular weight were abundantly and constitutively expressed in DRR1 , which consistent with the hypothesis that proteases were among the PHX(predicted highly expressed) proteins in DRR1. A broad range of gelatinolytic protease with molecular mass more than 140kD and caseinolytic protease with molecular mass more than 120kD were present in DRR1 cell. The prominent gelatinolytic protease of 174kD was also active when denatured by SDS and displayed different operation dynamics during the repair process post UV-irradiation and γ -irradiation , the protease showed its highest activity during γ -irradiation and in the late recovery stage post-irradiation. Some proteases were demonstrated to be induced specifically by irradiation which suggests that these proteases may regulate breakdown of proteins responsible in sequential pathway , and an elaborate and fine tuning protease system may exist in *D. radiodurans* during the repair process post irradiation. The expression of protease was also influenced by the nutrition of the culture. A rod-shaped and radiation resistant bacterium RR533.2 isolated from soil in Beijing , China was revealed to display similar zymography pattern using gelatin or casein as substrate.

Key words : *Deinococcus radiodurans* , Radiation resistant , Protease , Zymography

Foundation item : The Academy of Military Medical Science Innovation Foundation

* Corresponding author. Tel : 86-10-66932210 ; Fax : 86-10-68214653 ; E-mail : lvx@nic.bmi.ac.cn

Received date : 07-14-2004