

氮离子注入对耐辐射异常球菌 SOD 活性的影响 及其对 Mn-SOD 的诱导*

宋道军 李 红 王 纪 姚建铭 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程中心 合肥 230031)

摘 要 研究了氮离子注入对耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*)细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响及其对 Mn-SOD 的诱导。结果表明,当 20keV 氮离子的注入剂量低于 8×10^{14} ions/cm² 时, *D. radiodurans* 中 SOD 活性变化不大,当剂量在 $8 \times 10^{14} \sim 60 \times 10^{14}$ ions/cm² 范围内时, SOD 的活性随着注入剂量的增大逐渐提高,但大于 60×10^{14} ions/cm² 时,则逐渐下降;加入对不同金属辅基的 SOD 同工酶活性抑制剂 H₂O₂ 和氯仿-乙醇的研究表明,中高剂量下氮离子注入诱导的是 *D. radiodurans* 中 Mn-SOD 活性的提高,在正常生理条件及小于 8×10^{14} ions/cm² 的剂量下, *D. radiodurans* 中 SOD 总活性主要由 Fe-SOD 构成。

关键词 离子注入,耐辐射异常球菌,超氧化物歧化酶,诱导,酶活性抑制剂

分类号 Q55 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)04-0362-66

离子注入生物学是低能重离子注入生物学的简称,是八十年代中期兴起于我国的一门边缘交叉新学科^[1]。低能重离子是指能量在 10^4 eV~ 10^5 eV 之间,原子序数大于氦的剥离原子核,其在生命科学领域的应用即诞生了离子注入生物学。加速后的重离子具有一定的静止质量,注入生物体后可以使质量、能量和电荷共同作用于生物体,不同的质量数、电荷数和能量又可以根据需要进行组合,因此,离子注入生物体后质、能、电的联合作用比其它电离辐射对生物体的作用内容更为丰富和复杂^[2]。已有的研究表明,离子注入对生物体的作用具有能量沉积、质量沉积、动量传递和电荷的中和与交换的四种作用势^[3]。能量沉积不仅象其它电离辐射一样能导致生物体的直接损伤和间接损伤,而且还具有更高的线性能量转移值(LET)和尖锐的电离峰(又称为 Bragg 峰)^[4];质量沉积能引起细胞内生物大分子的移位和重排,并可生成新的产物^[5];动量传递可导致细胞表面溅射,并象手术刀那样对细胞表面进行刻蚀与加工,使细胞表面产生许多的微孔和洞,这一技术已经成功地用于转基因工程^[6];注入离子的电荷中和与交换效应由于极其复杂,因此,目前它对生物体的作用机理研究的还不深入^[7],但可以肯定,它对细胞的生理生化代谢乃至分子水平上的基因调控都会具有深刻的影响。总之,作为一门新兴学科,它已在基础理论研究和农作物、工业微生物诱变育种上取得了明显成效^[8,9]。

耐辐射异常球菌是一种极抗电离辐射和各种化学诱变剂的二联或四联微球菌,是 1956 年美国科学家 Anderson 及其同事在给极易腐败的罐装食品用 X-ray 灭菌时发现的^[10]。研究表明, *D. radiodurans* 中 SOD 活性比 *E. coli*K12 要高出 6 倍多,并推测这与其耐辐射有着密切的关系^[11]。然而,辐射会对 *D. radiodurans* 中 SOD 活性产生什么影

* 国家自然科学基金资助项目(No. 1965005)

收稿日期:1997-12-19,修回日期:1998-03-30

响,氮离子注入对其 SOD 活性的影响又如何,对组成其 SOD 总酶的不同金属辅基的同工酶何者影响最大,尚未见有报道。欧、美、日等西方国家的研究者认为,该菌极有可能被驯化成有效清除各种放射性污染的“清洁工”,并且由于某些抗放疗的癌细胞的抗辐射机理可能与该菌有相同或相似之处,加之它含有较为丰富和活性高的 SOD 特点^[10],开展对该菌的研究极具理论和实际意义,因此,自该菌被发现以来,西方国家一直开展着从遗传、生理生化到分子生物学水平上的研究。为此,本文开展了氮离子注入对耐辐射异常球菌 SOD 活性的影响及其对 Mn-SOD 的诱导的研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌种和培养方法

耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*) AS1.633 购于中国科学院微生物研究所。该菌生长于 TGY(胰蛋白胨 10g,葡萄糖 1g,酵母膏 5g,蒸馏水 1000mL)培养基上,生长温度 34℃,最适 pH6.8~7.2,固体培养时加 1.5% 的琼脂,发酵培养时,在 200r/min 下能良好生长。

1.2 使用试剂和仪器

本研究所用生化试剂均为国产和进口分析纯,7530-G 型 UV 分光光度计为上海上分仪器厂产品,2K15 型低温离心机为 Sigma 公司产品,JY-92II 型超声波细胞破碎仪为宁波新芝公司产品。

1.3 N⁺ 注入前样品的制备

取培养 18h 的活化菌种 *D. radiodurans* (约含 3×10^8 cells/mL),经适当稀释后取 50 μ L 均匀涂布于与空平皿一起灭菌的 4 块 2cm \times 3cm 的玻璃片上,以在显微镜下观察无相互重叠的细胞为宜,自然风干后立即进行 N⁺ 注入。

1.4 N⁺ 注入处理

在本研究室低能离子注入机上进行,能量为 20keV,剂量为 $0 \sim 10^{16}$ ions/cm²,注入靶室的真空度为 10^{-3} Pa,采用脉冲注入,每个脉冲 10s,间隔为 30s~50s,以消除大剂量下热效应。

1.5 N⁺ 注入后的细胞培养

注入后立即将玻璃片在无菌操作下从平皿中取出,放入已灭菌的含有 TGY 培养基的摇瓶中,200r/min 下洗脱的同时进行培养,通过测定 OD₆₀₀ 光密度的变化,取达到对数期生长后期的培养液在 $10,000 \times g$ 、4℃ 下离心收集湿菌体,并用 pH7.8,50mmol/L 的磷酸缓冲液洗 2 次,再悬于同种冷缓冲液中,用于 SOD 的提取和活性测定。

1.6 酶的提取和活性测定

SOD 的提取参照 Chou^[12] 的超声波破碎法进行,SOD 活性的测定参照 Beauchamp C 和 Fridovich I^[13] 的方法进行;

1.7 *D. radiodurans* 中 SOD 组成成分的鉴定

参照罗广华^[14,15] 的方法进行,即(1)取各处理酶提取液 1mL 加 H₂O₂ (使溶液的最终浓度为 5mmol/L),作用 40min 后测酶活性的变化;(2)取各处理酶提取液 1mL,加 0.3mL 的氯仿-乙醇(1:1.5v/v),作用 40min 后测酶活性的变化。

2 试验结果

2.1 N^+ 注入对 *D. radiodurans* SOD 总酶活性的影响

从图 1 可以看出,当剂量小于 8×10^{14} ions/cm² 时, *D. radiodurans* 中 SOD 总酶活性的变化不大,但当大于 8×10^{14} ions/cm² 时, SOD 总酶活性随着注入剂量的增大而逐渐升高,当超过 6×10^{15} ions/cm² 时, SOD 总酶活性随着注入剂量的增大又逐渐降低,这表明在 $8 \times 10^{14} \sim 70 \times 10^{14}$ ions/cm² 的中高剂量范围内, N^+ 注入诱导了 *D. radiodurans* 中 SOD 总酶活性的提高。

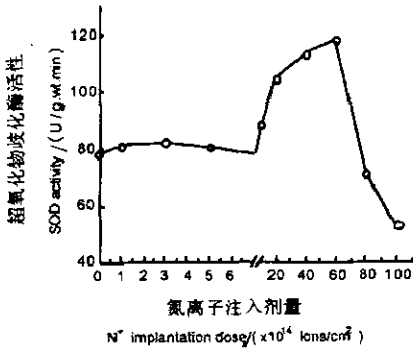


图 1 氮离子注入对耐辐射异常球菌超氧化物歧化酶活性的影响

Fig.1 Effect of N^+ implantation on SOD activity of *D. radiodurans*

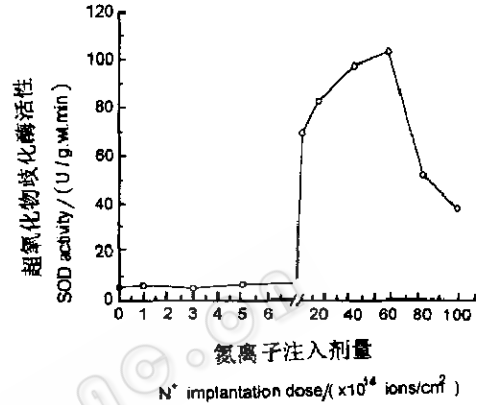


图 2 过氧化氢处理对耐辐射微球菌超氧化物歧化酶活性的影响

Fig.2 Effect of H_2O_2 on SOD activity of *D. radiodurans*

2.2 H_2O_2 后处理对 *D. radiodurans* 中 SOD 总酶活性的影响与对 Mn-SOD 活性的诱导

上述各处理加入 H_2O_2 作用后,再测定其 SOD 酶活性,结果发现,较小剂量的 N^+ 注入 *D. radiodurans* 后, SOD 酶活性受到严重抑制,其活性下降为原来的 1/16 左右,而大于 8×10^{14} ions/cm² 的剂量时, SOD 酶活性受到的影响反而较小,各处理下降了 10% 左右(图 2)。根据 Fe-SOD、CuZn-SOD 在 H_2O_2 作用下失活(失活程度为 CuZn-SOD > Fe-SOD),而 Mn-SOD 活性受到的影响较小的原理推测^[15],中高剂量的 N^+ 注入诱导的是 Mn-SOD 活性的提高,这一结果与孙娟等^[16]对 CHO 细胞的研究结果是一致的。

2.3 氯仿-乙醇后处理对 *D. radiodurans* 中 SOD 活性的影响

已知在氯仿-乙醇的作用下, Mn-SOD、Fe-SOD 活性受到抑制而失活(失活程度为 Mn-SOD > Fe-SOD),而 CuZn-SOD 活性几乎不受影响^[15],本研究在加入氯仿-乙醇作用后发现,较小剂量的 N^+ 注入处理 SOD 活性依然受到严重抑制,各处理活性下降为原来的 1/5 左右,而大于 8×10^{14} ions/cm² 剂量, SOD 活性受到抑制的程度更为严重,各处理活性约下降为原来的 1/20 左右(图 3),这一结果进一步验证了中高剂量的 N^+ 注入诱导的是 Mn-SOD 活性的提高。

3 讨论

本研究表明了中高剂量的 N^+ 注入诱导 *D. radiodurans* 中 SOD 活性的提高,这与 γ -rays 等电离辐射是低剂量辐照刺激生物量的提高效应不同,这显然与离子注入对生物体的作用原理与 γ -rays 等电离辐射不同有关,离子注入生物体多产生特殊的“马鞍型”存活曲线也说明了这一点^[17],但为何会产生这一结果,尚需深入研究。其次,本研究通过加入 H_2O_2 和氯仿-乙醇两种对不同金属辅基 SOD 同工酶活性抑制剂后处理的试验证明,中高剂量的 N^+ 注入诱导的是 Mn-SOD 活性的提高,这与有报道说 Mn-SOD 在生物体的抗辐射中比 Fe-SOD 和 CuZn-SOD 发挥着更大的作用^[16]的结果相符,这在一定程度上说明 *D. radiodurans* 耐辐射的部分原因。再者,当注入剂量小于 8×10^{14} ions/cm² 时,加 H_2O_2 作用后,由于 CuZn-SOD 的活性几乎完全丧失,Fe-SOD 的活性也仅保留 20% 左右^[15],而其总活性又很低,说明在未注入及小剂量注入的情况下,Mn-SOD 在 *D. radiodurans* 的总 SOD 活性中所占的比例并不高;用氯仿-乙醇作用后,Mn-SOD 和 Fe-SOD 的活性几乎完全丧失,这时所测的主要是 CuZn-SOD 的活性,而结果也只有对照的 1/5 左右,表明 CuZn-SOD 的活性在 *D. radiodurans* 的总 SOD 活性中所占的比例也不高,这些结果就间接说明了在未注入及小剂量注入的情况下,Fe-SOD 可能是构成 *D. radiodurans* 总 SOD 活性的主要部分。

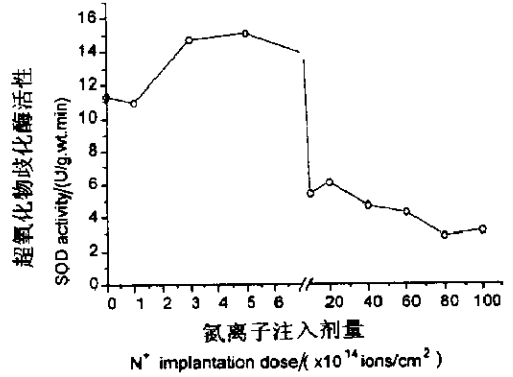


图3 氯仿-乙醇处理对耐辐射微球菌超氧化物歧化酶活性的影响
Fig.3 Effect of $CHCl_3$ - CH_3 - CH_2OH on SOD activity of *D. radiodurans*

参 考 文 献

- [1] Yu Zengliang. China Nuclear Science & Technology Report, CNIC-00746, ASIPP-0036, Beijing: Atomic Energy Press, 1993, 3~8.
- [2] Yu Zengliang, Deng Jianguo, He Jianjun et al. Nucl Instru Meth Phys Res, 1991, B59/60, 705~708.
- [3] 宋道军,余增亮.科学,1996,11:49~51.
- [4] 王立秋.河北农业大学学报,1994,17(4):95~98.
- [5] 余增亮.物理,1997,26(6):333~338.
- [6] Yang Jianbo, Yu Zengliang. Chinese Science Bulletin, 1995, 40(5):427~431.
- [7] 邵春林,余增亮.核技术,1997,20(2):70~73.
- [8] Shao Chunlin, Yu Zengliang. Radiat Phys Chem, 1994, 44(6):651~654.
- [9] 罗大珍,王宇钢,朱文.微生物学报,1997,37(4):312~315.
- [10] Anderson A W, Nordan H C, Cain R F et al. Food Technol, 1956, 10:575~577.
- [11] Wang Ping, Schellhorn H E. Can J Microbiol, 1995, 41:170~176.
- [12] Chou F I, Tan S T. J Bacteriol, 1990, 172(4):2029~2035.
- [13] Beachamp C, Fridovich I. Anal biochem, 1971, 44:276~281.
- [14] 徐军发,凌天翼,唐俊杰.生物化学杂志,1996,12(6):720~724.
- [15] 罗广华,王爱国,付爱根.生物化学与生物物理进展,1996,23(4):356~359.

[16] 孙 娟, 陈 媛, 周 玫等. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(1): 48~51.

[17] 宋道军, 余增亮. 生物物理学报, 1998, 14(1): 185~188.

THE EFFECT OF N^+ IMPLANTATION ON SOD ACTIVITY OF *DEINOCOCCUS RADIO DURANS* AND INDUCTION OF Mn-SOD

Song Daojun Li Hong Wang Ji Yao Jianming Yu Zengliang

(Centre of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics,

The Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstract The induction of Mn-SOD and effect of N^+ of 20keV implantation on SOD activity of *D. radiodurans* were investigated. The results were as follows: (1) SOD activity of *D. radiodurans* had a little change when implantation dose was less than $8 \times 10^{14} N^+ / cm^2$, and increased gradually from 8×10^{14} to $60 \times 10^{14} N^+ / cm^2$, and then decreased rapidly; (2) the test of adding H_2O_2 and $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ which could inhibit different types of SOD showed that most SOD activity of *D. radiodurans* was constituted by Fe-SOD in general physiology and less than $8 \times 10^{14} N^+ / cm^2$ dose, and higher implantation dose induced increase of Mn-SOD activity.

Key words N^+ implantation, *Deinococcus radiodurans*, SOD, Inducing function, Inhibitor of enzyme activity

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 1965005)

优惠的价格 优质的服务 欢迎在《微生物学报》刊登广告

《微生物学报》为中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办的综合性学术刊物, 创刊于 1953 年。主要报道我国普通微生物学, 工业、农业、医学、兽医微生物学, 病毒学, 免疫学, 以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果。为促进国内外学术交流, 为我国的经济建设服务。本刊面向国内外从事微生物学学科及其各有关分支学科研究的科研人员、大学教师、研究生和大学生。《微生物学报》入选世界著名的权威检索系统“CA”、“BA”和“PJK”等。在《中文核心期刊要目总览》(第 2 版)中, 本刊排生物类核心期刊第 6 名, 并为国内多种检索系统收录。《微生物学报》影响面广, 权威性强, 发行量大。被评为中国科学院、中国科协和国家优秀科技期刊。

欢迎垂询, 欢迎在《微生物学报》上刊登广告(文字版, 黑白版, 彩色版均可)。

电 话: (010)62630422

通讯处: 100080 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部