

γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体的损伤

陈晓明¹, 柳芳¹, 郑春^{2,*}, 李晓燕², 张建国¹, 严万里¹

(1. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010;

2. 中国工程物理研究院 核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621900)

摘要: 选用不同剂量 γ 射线辐照枯草芽孢杆菌营养体, 分别用细胞计数、黄嘌呤氧化及脉冲场凝胶电泳法分析了辐照后的细胞存活率、胞内 SOD 活性及细胞 DNA 双链断裂水平。研究发现, 随着 γ 辐照吸收剂量的增大, 细胞存活率不断下降; SOD 活性随剂量的变化无明显的规律; DNA 双链断裂水平与细胞存活率密切相关, DNA 的释放百分比和断裂水平值随辐照剂量增加而不断增大。结果表明: γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体有较高的灭活能力, 其损伤效果可能与 SOD 活性及双链断裂相关。

关键词: γ 辐照; SOD 活性; 双链断裂; 辐照灭菌

中图分类号: Q142.6; Q691.8; Q355 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-6931(2011)07-0875-05

Damage Effect of γ -rays on *Bacillus Subtilis* Vegetative Cells

CHEN Xiao-ming¹, LIU Fang¹, ZHENG Chun^{2,*}, LI Xiao-yan², ZHANG Jian-guo¹, YAN Wan-li¹

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology,

Mianyang 621010, China; 2. Institute of Nuclear Physics and Chemistry,

China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China)

Abstract: In order to investigate the damage effects of γ -rays at cell and molecular level, *Bacillus subtilis* vegetative cells were irradiated by ⁶⁰Co γ -rays at different absorbed doses. The cell survival rate was examined with the standard plate-count method. The intracellular SOD activity was measured by SOD kit through xanthine oxidase method. DNA double-strand breaks were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The cell survival rate decreases when γ -rays dose increases. A clear relation could not be found between intracellular SOD activity and absorbed dose. The DNA release percentage value and break level value increase obviously with γ -rays dose. Cell survival rate is related to DNA double-strand breaks level. It can be concluded that γ -rays have obviously damage effect on *Bacillus subtilis* vegetative cell, and the damage effect changes with SOD activity and DSB.

Key words: γ radiation; SOD activity; double-strand break; irradiation sterilization

收稿日期: 2010-05-05; 修回日期: 2010-08-30

基金项目: 中国工程物理研究院科学技术发展基金资助项目(2008A0103002); 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资助项目(07JGZB07); 国家自然科学基金资助项目(11075134); 绵阳市科技局资助项目(08S004-2)

作者简介: 陈晓明(1970—), 女, 四川蓬溪人, 副教授, 博士, 辐射生物学专业

* 通信作者: 郑春, E-mail: zhengchun@caep.ac.cn

自 1956 年美国 Ethicon 公司首次应用电子直线加速器对外科缝线的灭菌成功后,电离辐射灭菌技术迅速发展。电离辐射通过电离激发作用,改变各种生物大分子的结构功能,从而改变细胞功能、代谢、结构,以及机体组织、器官、系统及其相互关系,最终导致机体的损伤^[1]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种革兰氏阳性菌,能产生对热、紫外线、电离辐射和某些化学药品有很强抗性的芽孢,在医药卫生中常被作为热力、高压、电离辐射灭菌的指示菌。芽孢对电离辐射的耐受性较强,高剂量下的存活率也较高^[2-3],目前辐照灭菌主要集中在研究电离辐射对芽孢的损伤效应,对营养体的相关研究较少。实际上枯草芽孢杆菌也常以营养体的形式存在,因此考查电离辐射对营养体的损伤效应具有十分重要的现实意义。本实验通过对细胞存活率、超氧化物歧化酶(SOD)活性及 DNA 双链断裂水平的研究,考查 γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体的损伤效应,旨在辐射灭菌效应和机理的深入研究奠定基础。

1 材料和方法

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。

1.2 枯草芽孢杆菌营养体制备

营养琼脂培养基(NA 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,定容至 1 000 mL)培养菌体,37 °C,160 r/min 振荡培养 16 h,按 10% 比例接入新培养基,继续培养 12 h,离心收集菌体,PBS(无水磷酸氢二钠 2.83 g,磷酸二氢钾 1.36 g,蒸馏水 1 000 mL)洗涤 1 次,PBS 复溶。分装于 2 mL 冻存管(PP 材料)。

1.3 辐照处理

本研究按 γ 辐照吸收剂量设置 50、200、800、1 400、2 000 Gy 和空白对照共 6 个处理,每个处理 3 个重复,吸收剂量率为 15 Gy/min。 γ 辐照在中国工程物理研究院核物理与化学研究所的⁶⁰Co 源上进行。辐照后样品分为 3 份,分别进行细胞计数、胞内 SOD 活性测定和 DNA 双链断裂水平检测。

1.4 细胞存活率检测

采用平板计数的方法检测细胞存活率。取 100 μ L 样品加入至 900 μ L PBS 中进行倍比稀释,振荡混匀后取 100 μ L 到 NA 固体培养基上涂板,于 37 °C 恒温箱倒置培养 48 h 计数,以菌落数在 30~300 之间为有效数据。细胞存活率 = 辐照后活菌数/辐照前菌数。

1.5 胞内 SOD 活性测定

辐照样品离心弃上清,加入等量溶菌酶液(4 mg/mL),于 37 °C 下温育 30 min,超声处理 25 min,5 000 r/min \times 10 min,4 °C 离心取上清即为粗酶液。胞内 SOD 活性测定采用黄嘌呤氧化法(南京建成试剂盒)。用酶标仪(Thermo, Multiskan spectrum)测定 550 nm 处吸光值。规定每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

$$\text{总 SOD 活力} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} / 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \times \text{样本测试前的稀释倍数} \quad (1)$$

1.6 DNA 双链断裂分析

DNA 双链断裂水平(DSB)检测选用脉冲场凝胶电泳(PFGE)法。脉冲场电泳样品的制备及电泳条件参照文献[3-4]。标准 DNA 采用 225 kb~2.2 Mb 的酵母染色体 DNA(Bio-Rad 公司产品)。用 Quantity one 软件分析各泳道 DNA 荧光强度,DNA 的释放百分比值(PR)定义为各泳道中已移出加样孔的 DNA 荧光强度所占该泳道中总 DNA 荧光强度比值。采用平均分子量法^[5]计算 DNA 断裂产额 L (DSBs/kb),定量 DNA 断裂水平,则:

$$L = \left(\frac{X \times PR}{T} - m \right) / X \approx \frac{PR}{T} \quad (2)$$

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 片段释放百分比与对照的差值; T 为 DSB 片段平均大小,Mbp。

2 结果与分析

2.1 γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体的灭菌效果

枯草芽孢杆菌营养体受到吸收剂量为 50~2 000 Gy 的 γ 辐照后,细胞存活率随剂量不断下降(图 1)。运用 SPSS 10.0 对存活率作回归

分析,得到方程 $y = -0.635 - 0.001x$, $R^2 = 0.831$ (y 为存活率的对数值; x 为 γ 辐照吸收剂量, Gy)。根据方程求出 $D_{10} = 365$ Gy (D_{10} 为被辐照物中的细菌总数降低到原始值 1/10 时所需的吸收剂量, 它反映了细菌对电离辐射的耐受能力)。从图 1 可看出, 在低剂量辐照 (≤ 800 Gy) 时, 存活率随着辐照剂量急剧下降, 在 800 Gy 剂量时, 存活率为 0.25%, 当剂量大于 800 Gy 时, 存活率下降趋势较为平缓。

本研究之前采用 γ 辐照枯草芽孢杆菌芽孢样品, 得到辐照吸收剂量与细胞存活分数之间的关系满足方程 $y = -0.00037x$, $R^2 = 0.9513$, D_{10} 为 2700 Gy。对 D_{10} 水平比较, γ 辐照营养体的灭菌效果约是芽孢样品的 7.4 倍。

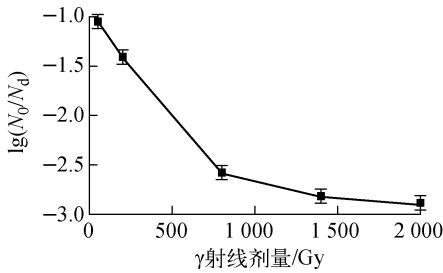


图 1 γ 辐照对枯草芽孢杆菌的灭菌效果
Fig. 1 Sterilizing effect of γ -rays on *Bacillus subtilis* vegetative cells
 N_0 ——细胞残留计数; N_d ——原始计数

2.2 γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体胞内 SOD 活性的影响

不同剂量 γ 辐照对枯草芽孢杆菌胞内 SOD 活性影响显著(图 2)。枯草芽孢杆菌经 γ 辐照后, 胞内 SOD 活性均显著低于对照 ($p < 0.01$)。由图 2 可见, 当辐照剂量为 50 Gy 时, 胞内 SOD 活性最低, 仅为对照的 54.9%, 而 200 Gy 辐照下酶活性明显上升, 随着剂量的继续增大, 酶活性先降低后升高。辐照剂量大于 800 Gy 时, SOD 活性随剂量持续升高 ($p < 0.01$)。对于 SOD 活性随剂量的这种奇怪变化现象, 推测可能与 γ 辐照对胞内 SOD 活性的影响受到多种因素的调节有关。首先, SOD 作为抗氧化体系中的成员, 其活性受到其他抗氧化酶表达的影响; 另外, 高剂量下 SOD 酶活性随辐照剂量的增大而升高的现象可表明 SOD 活

性还可能受到自由基的影响, 随剂量增大累积较多自由基, 诱导细胞 SOD 的表达功能增强, 使胞内 SOD 活性不断上升。对于上述推测有待进一步研究确认。

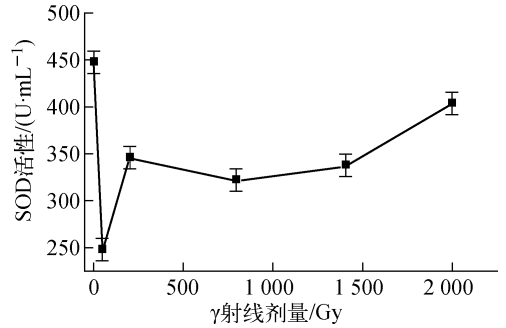


图 2 γ 辐照对枯草芽孢杆菌胞内 SOD 活性的影响
Fig. 2 Effect of γ -rays on *Bacillus subtilis* SOD activity

2.3 γ 辐照诱导的枯草芽孢杆菌 DSB 水平

分析辐照后 DNA 单双链断裂情况具有很大价值^[6]。图 3 所示为辐照样品脉冲场凝胶电泳图。由图 3 可看出, 随着辐照剂量的增大, 加样孔附近的荧光条带逐渐减弱并最终消失, 同时条带末端小分子量的荧光逐渐加强, 即随着 γ 剂量的增大, 大分子片段不断减少而小分子片段逐渐增加。

用 Quantity one 软件分析图 3 中条带的荧光强度, 并计算 PR 与 L。图 4a 和 b 分别为 PR

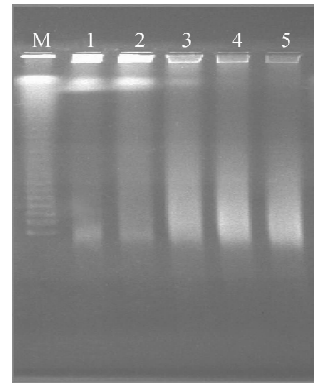


图 3 γ 辐照后枯草芽孢杆菌脉冲场电泳图
Fig. 3 PFGE electrophoretogram of *Bacillus subtilis* after γ radiation
M——marker; 1——50 Gy; 2——200 Gy; 3——800 Gy; 4——1400 Gy; 5——2000 Gy

与 L 随 γ 剂量的变化关系。由图 4 可看出, PR 和 L 均随剂量不断增大并逐渐趋于饱和。这与 Cedervall 等^[7]的结果一致。对 PR 及 L 分别进行回归分析, PR 满足方程 $y = -44.517 +$

$13.998 \ln x, R^2 = 0.952$ (y 为 DSB 的释放百分比; x 为 γ 辐照吸收剂量, Gy)。 L 满足方程 $y = -10156.700 + 2655.337 \ln x, R^2 = 0.923$ (y 为 DSB 的断裂产额; x 为 γ 辐照吸收剂量, Gy)。

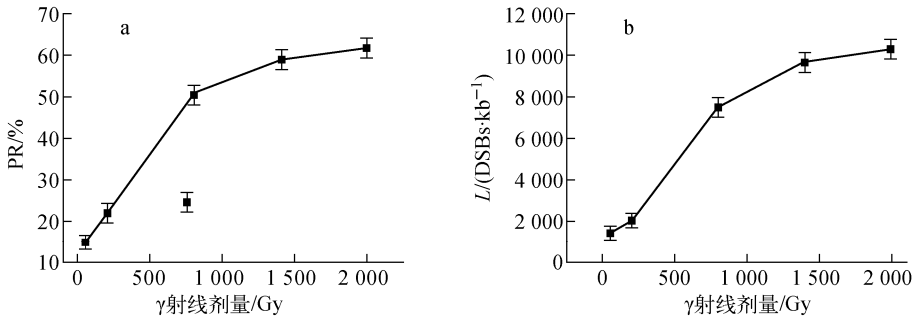


图 4 γ 辐照诱导的枯草芽孢杆菌 DSB 水平

Fig. 4 DSB level of *Bacillus subtilis* induced by γ radiation

3 讨论

3.1 辐射灭活细菌营养体和芽孢的效应差异

有研究得到 γ 辐照灭活枯草芽孢杆菌芽孢样品的剂量为 $1.7 \sim 2.5 \text{ kGy}$ ^[8]; 我们也曾得到同样条件下的 γ 辐照对枯草芽孢杆菌芽孢样品的 D_{10} 为 2700 Gy ; 另外, 在考查紫外线的损伤效应时, 得到枯草芽孢杆菌营养体和芽孢样品的 D_{10} 分别为 9.84 和 47.98 J/cm^2 ^[3]。这些结果表明, 枯草芽孢杆菌的不同存在状态对电离辐射的耐受性差异很大, 芽孢状态的辐射抗性远大于营养体。电离辐射的种类、细胞存在状态、细胞载体、干燥程度等均会影响电离辐射的生物损伤效果^[9-10]。

3.2 γ 辐照对细菌胞内抗氧化酶活性和 DNA 的影响

电离辐射的生物损伤效应是电离辐射的直接电离激发、自由基的氧化损伤以及细胞自身修复协同作用的结果。在本研究体系中, 由于菌体存在于水溶液中, γ 辐照会诱发水产生大量的氧自由基, 因此对生物体的伤害以间接作用为主, 主要包括自由基等对生物酶活性及对 DNA 的损伤。SOD 是一种清除体内超氧阴离子自由基的金属酶类, 其结合的金属种类不同, 可将 SOD 分为 3 类: Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD。而枯草芽孢杆菌主要含有 Mn 和 Fe-SOD 同工酶。枯草芽孢杆菌营养体的 SOD 活性随辐照剂量变化的结果显示, SOD 活性与剂

量无明显的相关性, 尤其在低剂量辐照下, 随剂量的变化无明显规律。这可能是因为 SOD 主要是使超氧阴离子自由基发生歧化反应, 生成氧气和过氧化氢, 但它并非生物体清除氧损害的最终酶类, 生成的过氧化氢要由体内的过氧化氢酶等来最终清除。过氧化氢作为机体内的信号分子, 会刺激其他一些抗氧化酶的表达, 同时也会对酶的活性造成损伤。因此, 电离辐射对 SOD 活性的效应受到多种因素调节, 各种抗氧化酶之间的相互影响, 抗氧化酶体系与自由基之间的动态效应均会影响其活性, 因此欲研究电离辐射抗氧化酶的效应, 应综合考虑其他几种抗氧化酶的活性, 进行深入研究。

电离辐射可引起 DNA 多种形式的改变, DSB 是损伤中常见和重要的形式, 其中非修复性的 DSB 被认为是辐照损伤细胞最重要的原发事件。Dahm 等^[11]认为, 随着辐照剂量的增大, DNA 双链断裂加剧, 其修复所需的时间也增长; 但细胞修复在照后 15 h 便基本完成, 照后 24 h 剩余的 DSB 即可认为是不可修复的 DSB。多数研究者认为非修复性的 DSB 可能与细胞致死有极其密切的关系。形成不可修复的 DSB 可能是因为细胞本身的性质和入射粒子的电离特性^[12]。自 1996 年美国 Cooper 实验室首先报道了 DSB 非随机分布的现象后, 国内外相继发现 DSB 非随机分布现象^[13-14]。本研究中, 枯草芽孢杆菌 DNA 双链断裂水平随 γ

射线剂量增大而不断上升。另外,当剂量为 50~800 Gy 时,细胞 DSB 明显增加,同时细胞存活率急剧下降,这进一步验证 DSB 与细胞存活率相关。DNA 作为遗传信息的载体,其损伤会导致生物大分子结构功能的改变,虽然 DSB 可能不是造成生物损伤的唯一途径,但深入研究辐照对 DNA 的损伤具有十分重要的意义。

4 结论

γ 射线穿透力强、射程远,剂量较为均匀,具有较强的杀菌力,是常用的电离辐射灭菌手段。本研究采用 50~2 000 Gy 的 γ 射线辐照枯草芽孢杆菌,从细胞水平、蛋白水平、分子水平系统考查了 γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体的损伤效应。在剂量率为 15 Gy/min 时,得到 D_{10} 为 365 Gy,当剂量达 800 Gy 时,灭菌率达 99.75%,表明 γ 辐照对枯草芽孢杆菌营养体有较强的损伤效应。

参考文献:

- [1] 刘树铮. 医学放射生物学[M]. 北京:原子能出版社,2006.
- [2] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514-525.
- [3] 周莉薇,陈晓明,张建国,等. 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[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2009,27(3):182-185.
ZHOU Liwei, CHEN Xiaoming, ZHANG Jianguo, et al. The study on ultraviolet tolerance and tolerant mechanism of a *Bacillus subtilis* radiation-resistant strain[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2009, 27(3): 182-185(in Chinese).
- [4] RYDERBERG B, LÖBRICH M, COOPER P K. DNA double-strand breaks induced by high-energy neon and iron ions in human fibroblasts: I. Pulsed-field gel electrophoresis method[J]. Radiation Research, 1994, 139: 133-141.
- [5] HOGLUND E, BLOMQUIST E. DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: Initial fragmentation[J]. Int J Radiat Biol, 2000, 76(4): 539-547.
- [6] 周光明,李文建,高清祥,等. DNA 双链断裂产额的新算法[J]. 原子核物理评论,2003,20(1):52-54.

- ZHOU Guangming, LI Wenjian, GAO Qingxiang, et al. A new method for calculating yield of DNA double-strand breaks[J]. Nuclear Physics Review, 2003, 20(1): 52-54(in Chinese).
- [7] DHARMENDRA K M, SOUMYAKANTI A, CHERUPALLY K K N, et al. DNA protective properties of vanillin against γ -radiation under different conditions: Possible mechanisms[J]. Mutation Research, 2007, 634(1-2): 69-80.
- [8] CEDERVALL B, WONG R, ALBRIGHT N, et al. Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis[J]. Radiation Research, 1995, 143(1): 8-16.
- [9] FURUTA M, SUWA T, KUWABARA Y, et al. Electron-beam sterilization of laboratory animal diets-sterilizing effect of 10 MeV electrons from a linear accelerator[J]. Exp Anim, 2002, 51(4): 327-334.
- [10] 陈晓明,谭碧生,张建国,等. 快中子辐照对枯草芽孢杆菌的灭菌效果研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2007,25(3):166-169.
CHEN Xiaoming, TAN Bisheng, ZHANG Jianguo, et al. Study on the sterilizing effects of fast neutron radiation on *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2007, 25(3): 166-169(in Chinese).
- [11] DAHM D J, DIKOMEY E. Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks[J]. Int J Radiat Biol, 1994, 66(5): 553-555.
- [12] 周光明,李文建,王菊芳,等. γ 射线诱导的肝癌细胞 DNA 双链断裂[J]. 核技术,2000,23(11): 776-779.
ZHOU Guangming, LI Wenjian, WANG Jufang, et al. DNA double strand breaks induced by γ -ray[J]. Nuclear Techniques, 2000, 23(11): 776-779(in Chinese).
- [13] LÖBRICH M, COOPER P K, RYDBERG B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation [J]. Int J Radiat Biol, 1996, 70(55): 493-503.
- [14] PRISE K M, PINTO M, NEWMAN H C, et al. Review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering[J]. Radiation Research, 2001, 156(5): 572-576.