

文章编号: 1007-4627(2008)04-0397-05

低能离子注入*E. coli* K12的 HRS/IRR效应及 *recA* 基因在其诱发中的作用*

杨天佑^{1,2}, 李培睿², 田静¹, 李宗伟², 秦广雍²

(1 河南科技学院生命科技学院, 河南 新乡 453003;

2 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 以MG1655(野生型), LE392(*recA*⁻)和DH5 α (*recA*⁻)3株*E. coli* K12菌株为材料, 研究了30 keV N⁺离子注入*E. coli* K12时HRS/IRR效应的诱发情况及*recA*基因在其诱发中的作用。结果显示: 小于 10×10^{14} ions/cm²低剂量离子注入大肠杆菌可诱发HRS/IRR效应; 30 keV N⁺离子注入MG1655, LE392菌株都可诱发HRS/IRR效应, 而在DH5 α 菌株中无法诱导IRR效应。*recA*⁻与HRS/IRR效应相斥性表明*recA*基因在HRS/IRR效应的诱发中发挥了重要作用。

关键词: HRS/IRR; N⁺注入; *E. coli* K12; *recA*

中图分类号: O53 **文献标识码:** A

1 引言

20世纪末, 英国Gray实验室Marples等^[1]以40多株不同的细胞系为材料系统研究低剂量电离辐射对细胞存活率的影响时, 发现在小于0.5 Gy的剂量范围内, 随剂量的增加, 细胞存活急剧下降, 而随后在0.5—1 Gy剂量范围内细胞的存活率有所上升, 他们将低剂量范围内这种反常剂量存活效应称为HRS/IRR, 即低剂量辐射超敏感效应(low-dose hypersensitivity, 简称HRS)及增强的辐射抗性(increased radioresistance, 简称IRR)^[2-4]。国内学者也发现并报道了类似效应, 余增亮等^[5, 6]利用keV能量范围的低能离子注入微生物、植物组织和种子等时, 发现随着辐照剂量的增大, 生物存活率呈现先降后升再降的存活现象, 他们将这种完全不同于辐射中常见的指数性和肩型下降的剂量存活效应称为“马鞍型”。目前, 由于HRS/IRR效应在癌症治疗方面的意义突出, 已经成为辐射生物学中研究的热点。

HRS/IRR效应的相关研究目前主要集中在国外, 国内相关研究报道不多^[4, 7, 8]。国外主要以哺乳动物细胞为主, 而在微生物中的研究报道甚少。特别是, HRS/IRR效应形成的分子机理国内外目

前还没有定论, 只是存在一些辐射生物学假说和生物物理模型, 一时还难以从分子生物学的角度阐明其形成机制。不过, 辐射生物学家比较一致的看法是DNA双链断裂的损伤修复状态可能在其形成中发挥了重要的作用^[9]。大肠杆菌中*recA*在DNA双链断裂重组修复中起着很关键的作用^[10, 11]。在研究低能离子注入*E. coli* K12野生型菌株MG1655诱发HRS/IRR基础上, 以*recA*缺陷型*E. coli* K12菌株DH5 α (*recA*⁻)为主要研究材料, 以*E. coli* K12野生型菌株MG1655和*E. coli* LE392(*recA*⁺)为对照, 研究低能离子注入时HRS/IRR效应的诱发情况, 探讨了*recA*基因在低能N⁺离子注入*E. coli* K12诱发HRS/IRR效应中的作用, 从分子水平证实*recA*基因在HRS/IRR效应诱发中的作用, 从而揭示HRS/IRR效应与*recA*参与的DNA修复途径的内在关联, 并从*recA*参与的DNA损伤修复角度推测了*E. coli* K12中HRS/IRR效应的形成机制。

2 实验材料和方法

2.1 实验菌株

E. coli K12野生型菌株MG1655; *recA*⁻的*E. coli* K12菌株DH5 α , 基因型为*recA1*, *supE44*,

* 收稿日期: 2008-04-10; 修改日期: 2008-05-19

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(2004CB719604); 国家自然科学基金资助项目(10505018)

作者简介: 杨天佑(1978—), 男(汉族), 河南安阳人, 博士, 讲师, 从事辐射生物学研究; E-mail: yangtianyou2004@163.com

$\Delta lacU169(\varphi 80 lacZ\Delta M15)$, $hsdR17$, $endA1$, $gyrA96$, $thi-1$, $relA1$; $recA^-$ 的 *E. coli* K12 菌株 LE392, 基因型为 $supE44$, $supF58$, $hsdR514$, $galK2$, $galT22$, $metB1$, $trpR55$, $lacY1$, 该菌株为 $recA$ 基因无缺损的 *E. coli* K12 菌株; 3 株 *E. coli* K12 均用 LB 培养基培养, 温度 37 °C。

2.2 实验方法

2.2.1 制备菌悬液

挑 MG1655, LE392, DH5 α 3 株菌的单菌落于 LB 液体培养中 37 °C, 250 r/min 摇床培养 3 h, 获得指数期细胞, OD₆₀₀ 值为 0.6 左右。

2.2.2 注入前样品的干燥处理

分别取 100 μ l MG1655, LE392, DH5 α 的菌悬液均匀涂于洁净无菌的载玻片上置于超净工作台中自然风干。

2.2.3 30 keV N⁺ 注入处理

分别取 *E. coli* MG1655, LE392, DH5 α 3 份样品放入相同的培养皿中, 进行离子注入处理。处理时设 3 株菌的真空对照, 其中每个菌株同时设 3 个平行样品。注入参数: 离子为 N⁺ 离子, 能量为 30 keV, 注入剂量为 $1 \times 10^{14} - 300 \times 10^{14}$ ions/cm²。实验在郑州大学离子束生物工程实验室进行。

2.2.4 注入后处理

将处理后的样品洗脱, 适当稀释后涂于 LB 平板上, 每个稀释度做 3 个平行样品, 37 °C 培养 14 h, 采用平板菌落计数法, 通过英国 Symbiosis 公司 PROTOCOL 菌落计数系统完成。存活率的计算方法: 注入处理样品的存活率 = 注入处理后的活菌数 / 真空处理后的活菌数。

3 实验结果

3.1 30 keV 的 N⁺ 注入 *E. coli* K12 的 HRS/IRR 效应

30 keV 的 N⁺ 离子注入 *E. coli* K12 (MG1655 菌株) 的剂量存活效应曲线见图 1。

由图 1 可见, 30 keV 的 N⁺ 离子注入 *E. coli* K12 的剂量存活效应存在一个急剧下降和回升的过程。在小于 5×10^{14} ions/cm² 的剂量范围内, 随剂量的增加细胞存活率急剧下降, 当剂量增至 5×10^{14} ions/cm² 时, *E. coli* K12 的存活率只有 0.45, 该剂量范围内 *E. coli* K12 表现出对 30 keV N⁺ 离子注入极为敏感, 呈现 HRS 效应; 随着剂量的增加, 在

$5 \times 10^{14} - 10 \times 10^{14}$ ions/cm² 的剂量范围内, *E. coli* K12 的存活率又有所回升, 当剂量升至 10×10^{14} ions/cm² 时其存活率达到最大约为 0.87, 在大于 10×10^{14} ions/cm² 的剂量范围内 *E. coli* K12 的存活率随剂量增加平缓下降, 呈现出 IRR 效应。由此可见, 30 keV 的 N⁺ 离子注入 *E. coli* K12 可诱发 HRS/IRR 效应。

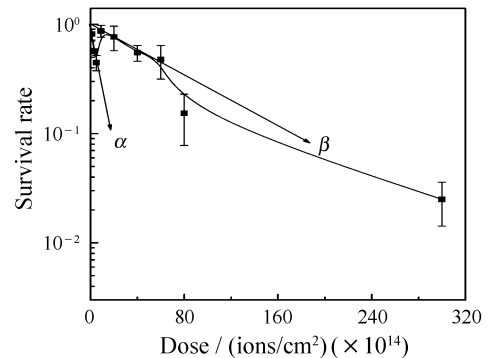


图 1 30 keV N⁺ 注入 *E. coli* K12 的存活情况

3.2 30 keV 的 N⁺ 离子注入 *E. coli* K12 剂量存活效应中两个下降过程

低能离子注入 *E. coli* K12 的剂量存活效应中存在两个下降的过程, 如图 1 中 α 线和 β 线所示。 α 线和 β 线分别表示随低能离子注入剂量增加 *E. coli* K12 存活率下降的趋势, 其斜率绝对值的大小可以反映了细胞对 N⁺ 离子注入敏感性的大小, 即按单位剂量计 N⁺ 离子注入对细胞致死效应的大小。斜率越大, 说明细胞对 N⁺ 离子注入越敏感, 反之, 越不敏感。 α 线和 β 线的斜率可以通过计算两个下降过程趋势线的斜率来表示。两个下降过程趋势线的斜率见图 2 和图 3。

图 2 和图 3 中 α 线和 β 线的斜率分别为 -0.104 1 和 -0.011 2, α 斜率与 β 斜率绝对值之比约为 10, 说明, *E. coli* K12 对 $10 \times 10^{14} - 80 \times 10^{14}$ ions/cm² 剂量的 N⁺ 离子注入耐受力比低剂量 $0 - 5 \times 10^{14}$ ions/cm² 高大约 10 倍。在较低的剂量范围内 ($0 - 5 \times 10^{14}$ ions/cm²) *E. coli* K12 表现出对 30 keV 的 N⁺ 离子注入极为敏感, 随着剂量增加存活率急剧下降; 当剂量增加达到阈值 (5×10^{14} ions/cm²) 时, *E. coli* K12 对 N⁺ 离子注入的抵抗性增加了 10 多倍。由此可见, 在小于 5×10^{14} ions/cm² 的较低剂量范围内, 按单位剂量计小于 5×10^{14} ions/cm² 的较低剂量的比大于 10×10^{14} ions/cm² 较高剂量的 N⁺ 离子对细胞的

损伤作用更为显著。可见,大肠杆菌对低能离子辐射极为敏感,而对高剂量低能离子辐射表现出一定的辐射抗性。

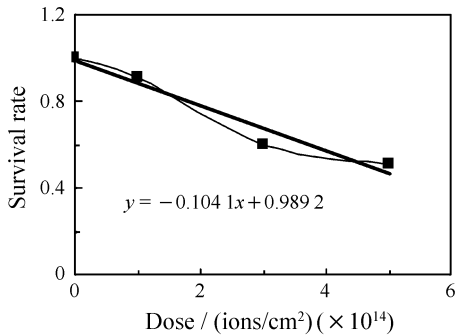


图2 N^+ 离子注入*E. coli* K12剂量存活曲线中 α 线

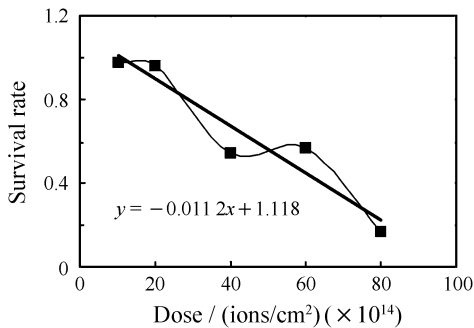


图3 N^+ 离子注入*E. coli* K12剂量存活曲线中 β 线

3.3 *recA*基因对*E. coli* K12辐射敏感性的影响

低能 N^+ 离子注入MG1655, DH5 α , LE392 3株*E. coli* K12菌株剂量存活曲线,见图4。

由图4可以看出在MG1655, LE392, DH5 α 3株*E. coli* K12中,1, 3, 5, 10, 20, 40, 60和80 ($\times 10^{14}$ ions/cm²)任一剂量点, DH5 α 菌株的存活率都比相同剂量下另外两株(MG1655和 LE392)低, DH5 α 对低能离子注入比另外两株更敏感。可见*recA*基因在细胞抗辐射中发挥了重要的作用,其缺陷存在与否直接影响细胞对离子注入的敏感性。

另外, 30 keV N^+ 离子注入MG1655和LE392时,在小于 5×10^{14} ions/cm²的剂量范围内,随剂量的增加两者的存活率都呈现下降趋势;在稍高剂量范围内($5 \times 10^{14} - 10 \times 10^{14}$ ions/cm²), MG1655和LE392的存活率又有所回升;剂量升至 10×10^{14} ions/cm²时MG1655存活率达到峰值;在高剂量范围(大于 20×10^{14} ions/cm²)时,随剂量增加两者的存活率均逐渐下降。可见,低能离子注入MG1655和LE392菌株存在HRS/IRR效应。在小于 5×10^{14}

ions/cm²的剂量范围, *recA*基因缺陷的DH5 α 菌株表现出HRS效应,但是随着剂量增加,细胞存活率并没有表现上升的趋势,即没有表现出IRR效应。30 keV N^+ 离子注入MG1655, LE392和DH5 α 菌株都可以诱导产生HRS效应,但是只能在*recA*⁺的菌株中诱导产生IRR效应,而在*recA*⁻却无法诱导IRR效应。

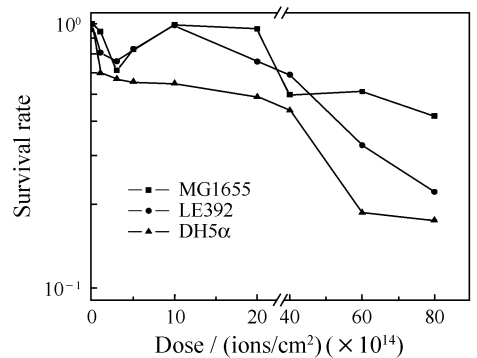


图4 30 keV N^+ 离子注入*E. coli* K12 MG1655, LE392, DH5 α 的存活情况

4 讨论

Skov等^[12]研究结果表明,失去损伤修复的XR.V15B, V79和MO59K 3株细胞系,都没有HRS/IRR效应, Wojewodzka等^[13]对人淋巴细胞也给出了IRR效应是双链断裂修复的结果, Mitchel等^[14]利用rad52缺陷型(重组功能缺失)的芽殖酵母突变体研究HRS/IRR,发现该菌株完全丧失了HRS/IRR效应。虽然HRS/IRR的分子机制还有待于进一步阐明,但是DNA损伤及修复被认为在其中发挥重要的作用,特别是DNA双链断裂的损伤修复状态^[15]。本研究利用*recA*缺陷的*E. coli* K12菌株研究HRS/IRR效应诱发情况,发现DH5 α 完全丧失诱发IRR效应的能力,可以看出*recA*参与的DNA损伤修复的途径在HRS/IRR效应中的重要作用。*E. coli* K12细胞内DNA损伤修复存在多种修复系统,常见的有光复活(photoreactivation)、切除修复(excision repair)、重组修复和SOS反应(induction repair or SOS repair)等。*recA*主要参与重组修复和SOS修复。作者推测重组修复和SOS修复这两种DNA损伤修复途径可能对于HRS/IRR效应的诱发尤为重要。但是,目前的研究不足以充分证实重组修复和SOS修复中哪条途径对于反常效应诱发贡献更大, HRS/IRR效应诱发的分子机制还有待于

深入研究。

根据国外在哺乳动物细胞中提出的HRS/IRR效应的诱导修复模型中的阈值假说^[2]及国内谢传晓博士的同类研究结果^[16], 结合本文研究结果可对低能离子注入*E. coli* K12诱发HRS/IRR效应的可能机制作以下推测: 较低剂量($\leq 5 \times 10^{14}$ ions/cm²)低能离子注入时, 注入离子导致DNA的损伤, 然而, 此时DNA的损伤程度无法诱导*recA* 基因高表达, 细胞内的RecA蛋白只处于一种本底水平, 不足以诱导细胞启动RecA相关的修复途径及时修复损伤的DNA, 特别是双连断裂的DNA分子, 细胞表现为对辐射极为敏感, 随剂量增加*E. coli* K12存活率急剧下降; 当剂量达到一定的剂量阈值(5×10^{14} ions/cm²左右), 注入离子对DNA的损伤诱导*recA* 基因高表达, 大量的RecA蛋白启动了细胞内重组修复、SOS等DNA修复途径, 使得双连断裂的DNA分子及时得以修复, 从而使得细胞存活增加; 在高剂量($> 10 \times 10^{14}$ ions/cm²)离子注入时, 此时DNA损伤严重, 辐射对DNA损伤作用已超出了细胞的损伤修复的能力, 所以, 随注入剂量增大, 虽然细胞表现为对离子注入具有一定抗性, 但其存活细胞也会越来越少。HRS/ IRR效应的分子机理目前只是处在一个推测阶段, 其中还有大量细节性问题还不清楚, 需进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Marples B, Joiner M C. *Radiat Res*, 1993, 133: 41.
 [2] Joiner M C, Marples B, Lambin P, *et al.* *IntJ Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 49: 379.
 [3] Joiner M C, Lambin P, Malaise E P. *Mutation Res*, 1996, 358: 171.
 [4] Jin Xiaodong, Li Qiang. *Nuclear Physics Review*, 2007,

24(3): 228(in Chinese).

(金晓东, 李 强. 原子核物理评论, 2007, 24(3): 228.)

- [5] Shao Chunlin, Yu Zengliang. *核技术*, 1997, (7): 423(in Chinese).
 (邵春林, 余增亮. *核技术*, 1997, (7): 423.)
 [6] Shao Chunlin, Wu Yuejin, Cheng Beiji, *et al.* *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1995, (1): 37. (in Chinese).
 (邵春林, 吴跃进, 程备久等. *核农学报*, 1995, (1): 37.)
 [7] Wu Jian, Dai Guifu, Li Jinfang, *et al.* *Nuclear Technique*, 2005, 28(8): 598(in Chinese).
 (吴 健, 戴桂馥, 李金芳等. *核技术*, 2005, 28(8): 598.)
 [8] Chang Shenghe, Qin Guangyong, Li Zongwei, *et al.* *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 1995, 22(2): 196. (in Chinese).
 (常胜合, 秦广雍, 李宗伟等. *核农学报*, 1995, 22(2): 196.)
 [9] Wykes S M, Piasentin E, Joiner M C. *Radiat Res*, 2006, 165(5): 516.
 [10] Cox M M. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1999, 63: 310.
 [11] Roca A I, Cox M M. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1997, 56: 129.
 [12] Skov K, Marples B, Matthews J B, *et al.* *Radiat Res*, 1994, 138: 126.
 [13] Wojewodzka M, Wojcik A, Szumiel I, *et al.* *Wurzburg: 10th ICRR Society*, 1995, 307.
 [14] Mitchel R E, Morrison D P. *Mutat Res*, 1987, 183: 149.
 [15] Sun Zhizeng, Zhou Pingkun. *Foreign Medical Science. Section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2004, 28(2): 82(in Chinese).
 (孙志增, 周平坤. *国外医学放射医学核医学分册*, 2004, 28(2): 82.)
 [16] Xie Chuanxiao. *Base Substitutions, Damages & Their Repair Induced by Low Energy N⁺ Implantation in Escherichia Coli*(Doctoral Thesis). Hefei: Institute of Plasma Physics of Chinese Academy of Sciences, 2004, 77(in Chinese).
 (谢传晓. 低能N⁺离子注入大肠杆菌诱发碱基置换突变DNA损伤及修复. 合肥: 中国科学院等离子体物理研究所, 2004, 77.)

HRS/IRR in *E. coli* K12 Implanted by Low Energy Ion Beam and Effect of *recA* Gene on HRS/IRR^{*}

YANG Tian-you^{1, 2, 1)}, LI Pei-ru², TIAN Jing¹, LI Zong-wei², QING Guang-yong²

(1 Life Science and Technology College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China)

(2 Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The HRS/IRR in *Escherichia coli* had been investigated with *E. coli* K12 wild strain MG1655 irradiated by the 30 keV N⁺. The curve of the dose-survival effect showed the 30 keV N⁺ ion could induce the HRS/IRR at the dose less than 10×10^{14} ions/cm². Moreover, the effect of *recA* gene in HRS/IRR inducement had been researched with three *E. coli* K12 strains, wild strain MG1655, LE392 (*recA*⁺) and DH5 α (*recA*⁻). The results showed the IRR was disappeared in *recA*⁻ DH5 α strain, but the HRS/IRR appeared in wild strain MG1655 and *recA*⁺ LE392, which suggested that *recA* gene and the DNA damages & their repairs including *recA* gene were essential element in HRS/IRR inducement.

Key words: HRS/IRR; N⁺ implantation; *E. coli* K12; *recA*

* Received date: 10 Apr. 2008; Revised date: 19 May 2008

* Foundation item: Major State Basic Research Development Program of China(2004CB719604); National Natural Science Foundation of China (10505018)

1) E-mail: yangtianyou2004@163.com