

文章编号: 1007-4627(2011)01-0122-04

不同 LET C 离子束对粘红酵母菌的突变效应分析*

孙海宁^{1,2}, 王菊芳^{2, #}, 马爽², 陆栋², 吴鑫², 李文建²

(1 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要:以粘红酵母菌 *Rhodotorula glutinis* AY 91015 为材料, 研究了不同传能线密度(LET)的 C 离子对粘红酵母菌的失活截面和突变截面, 评估了不同 LET 的 C 离子对微生物的失活效应和突变效应。结果表明, C 离子 LET 为 120.0 keV/ μm 时, 单个粒子对粘红酵母菌的失活截面最大, 为 4.37 μm^2 , 接近酵母菌细胞核的平均核截面; LET 为 96.0 keV/ μm 时, 单个粒子对粘红酵母菌的突变截面最大。通过对 C 离子束致突变能力的分析发现, C 离子在 LET 为 58.2 keV/ μm 时突变能力最强, 这一结果显示在经 C 离子辐照后存活下来的粘红酵母菌中, 可以引起有效突变的最佳 LET 为 58.2 keV/ μm 左右, 此时所对应的碳离子能量约为 35 MeV/u。这些结果表明, C 离子对粘红酵母菌的最佳致死效应和最佳致突变效应存在于不同的能量区域。

关键词: C 离子; 传能线密度; 失活效应; 突变效应; 粘红酵母菌

中图分类号: Q691; R818.74

文献标识码: A

1 引言

重离子束与传统诱变源相比, 在与生物材料相互作用方面具有明显优势: 重离子束具有高的传能线密度(Linear Energy Transfer, 简称 LET), 在与细胞相互作用的时候, 产生高的电离和激发事件, 容易对细胞造成损伤^[1]。它可以影响细胞的生理生化功能, 引起细胞中遗传物质的改变, 具有突变率高和突变谱广等特点^[2]。重离子不仅对哺乳动物细胞具有很强的致死作用和致畸变作用^[3-4], 对微生物也有很强的致突变效应^[5-9]。目前, 关于不同品质的同一种重离子对真核生物的失活效应、突变效应及这些效应与 LET 的关系的报道还比较少。

粘红酵母菌可以产生类胡萝卜素(carotenoid)而使菌落外观呈粉红色^[10]。在受到外界的不良刺激或辐射作用下, 参与类胡萝卜素代谢的酶可能发生改变而产生变异菌株, 使类胡萝卜素表达困难或表达过量, 从而使酵母菌落变为白色或深红色。因此, 通过菌落颜色的改变就很容易进行粘红酵母菌类胡萝卜素突变菌的鉴别。

本文以粘红酵母菌 *Rhodotorula glutinis* AY 91015 为材料, 研究了不同 LET 的 C 离子(14.9—120.0 keV/ μm)与粘红酵母菌失活效应和突变效应的关系, 并探讨了经 C 离子辐照后存活下来的粘红酵母菌可以引起有效突变的最佳 LET 值的区域。

2 材料和方法

2.1 菌种和培养基

粘红酵母菌 *Rhodotorula glutinis* AY 91015 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。挑取少量斜面保存的酵母菌在改良的 YEPD 培养基中于 28 °C 培养 2—3 d, 培养基(g/l): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母粉 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, KH_2PO_4 1.0, pH 为 5.5。将培养好的酵母菌悬液用磷酸缓冲液冲洗并调整浓度到 2×10^8 yeasts/ml, 以备 C 离子照射使用。

粘红酵母菌悬液在经过辐照和稀释至适当的浓度后, 接种到直径为 90 mm 铺有 YEPD 培养基的平皿中。培养基(g/l): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母

* 收稿日期: 2010-05-13; 修改日期: 2010-06-01

* 基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KJ CX2-YW-N34-2); 中国科学院西部之光人才培养计划(Y006060XB0)

作者简介: 孙海宁(1985—), 女(汉族), 辽宁瓦房店人, 硕士研究生, 从事微生物与生化药学研究;

E-mail: shndaisy@yahoo.com.cn

通讯联系人: 王菊芳, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn

粉 10, 琼脂 20。在 28 °C 下培养 5 d, 用以统计辐照后粘红酵母菌的失活率和类胡萝卜素突变率。

2.2 辐照

C 离子束辐照在中国科学院近代物理研究兰州所重离子研究装置 HIRFL 上进行。为了得到不同物理参数的 C 离子束(见表 1), 在某些情况下, 需要加上不同厚度的降能片(Lucite)来获取需要的 C 离子束。剂量由空气电离室测得并以单位面积上的粒子数计^[11]。

表 1 用于酵母菌辐照实验的不同 LET C 离子束的物理参数*

初始能量 /(MeV/u)	Lucite 厚度 /(mm)	平均能量 /(MeV/u)	平均 LET /(keV/μm)
235	0	233.3	14.9
100	0	96.7	27.1
80.5	0	75.0	32.8
80.5	10.6	36.5	58.2
80.5	13.6	20.0	96.0
100	22.0	15.0	120.0

* 每次实验有 3 个平行样品, 实验结果是平行样品的平均值±标准差(X±SD), 对照样品是同时准备的没有经过辐照的样品; 平均能量是指离子束到达样品时的平均能量。

2.3 失活效应和突变效应的分析

以 10 倍稀释法将经过辐照的样品稀释至适宜的浓度后接种到铺有 YEPD 琼脂培养基的平皿中, 稀释的结果以每皿得到约 2×10² 个单菌落来检测失活效应、2×10⁴ 个单菌落检测突变效应为宜。失活的酵母细胞由于失去分裂增长的能力而不能形成单菌落, 所以受照酵母的存活分数 SF (Survival Fraction) 就是受照样品的菌落数(S)与对照样品菌落数(S₀)的比值, 即

$$SF = \frac{S}{S_0} = \exp(-\sigma_i \Phi), \quad (1)$$

这里, Φ 是粒子注量(particles/cm²), σ_i 是失活截面(μm²)^[8]。

正常的粘红酵母菌为粉红色, 突变的粘红酵母菌则为白色或深红色。突变频率 MF (Mutation Frequency) 是突变菌落数(N_m)与总菌落数(N)的比值, 如公式(2)所示:

$$MF = \frac{N_m}{N} = \sigma_m \Phi, \quad (2)$$

这里 σ_m 是突变截面(μm²)^[8]。

存活曲线和突变曲线及相应的常数 σ_i 和 σ_m 通过 origin 7.0 软件由公式(1)和(2)拟合得到。

3 结果

粘红酵母菌经过不同 LET C 离子辐照后得到的存活效应曲线(见图 1)。这里, 纵坐标是存活分数, 横坐标是离子注量。可见, 酵母菌存活分数随剂量的增加呈指数下降的趋势, LET 值越高, 失活效应越明显。

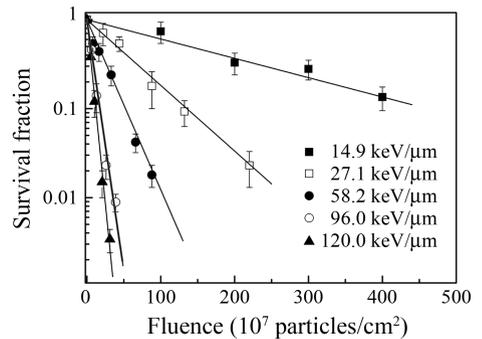


图 1 粘红酵母菌经不同 LET C 离子束辐照后存活分数与粒子注量的关系

在重离子辐射研究中, 细胞失活截面是研究较多的一项指标, 它是对粒子与生物体相互作用后引起的失活效应的定量描述, 一般随 LET 值的增加而增加, 并与细胞核的大小及分布有关^[9]。将从存活曲线得到的斜率 σ_i 值做进一步分析, 得到 σ_i 值与 LET 的关系(见图 2)。可看出, 随着 C 离子 LET 的增加, 失活截面逐渐增大并达到饱和, 在 120.0 keV/μm 时得到最大值, 为 4.37 μm², 接近于粘红酵母菌细胞核的平均核截面(4.98±0.79) μm²。

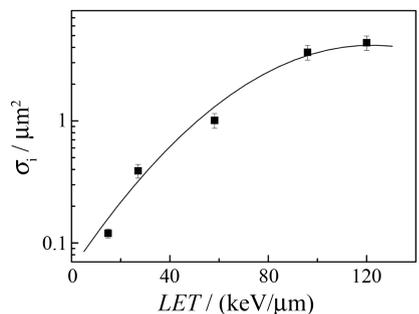


图 2 粘红酵母菌失活截面 σ_i 与 C 离子 LET 的关系

粘红酵母菌经过不同碳离子辐照后得到的突变效应曲线见图 3。可以看出, 突变频率随剂量的增

加呈线性增加的趋势。同时，突变效应随着 LET 值的增加逐渐明显，但在 LET 为 120.0 keV/μm 时反而略有减小，低于 LET 为 96.0 keV/μm 的结果。这一点在 σ_m -LET 关系图中表现得更为明显（见图 4）：突变截面先随 LET 的增加而增加，并在 96.0 keV/μm 达到最大值，然后在 LET 为 120.0 keV/μm 处又表现出下降的趋势。

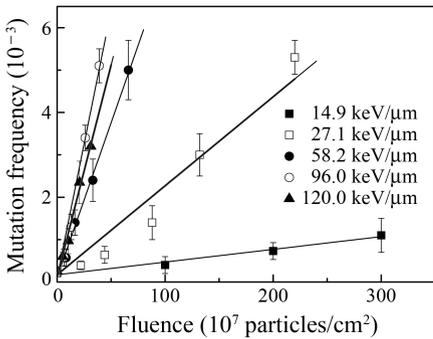


图 3 粘红酵母菌经不同 LET C 离子束辐照后类胡萝卜素突变株产生频率与粒子注量的关系

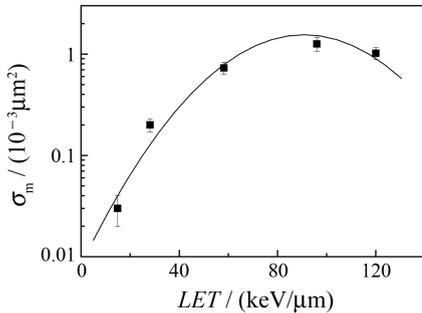


图 4 粘红酵母菌突变截面 σ_m 与 C 离子 LET 的关系

从以上结果可以看出，突变截面的值要比失活截面的值小，而且最大失活截面和最大突变截面分布在不同的 LET 值区域。

表 2 不同 LET 的 C 离子辐照粘红酵母菌后得到的失活截面 σ_i 、突变截面 σ_m 及致突变能力 (σ_m/σ_i) 的比较

LET /(keV/μm)	$\sigma_i/\mu\text{m}^2$	σ_m / $\mu\text{m}^2 (\times 10^{-3})$	σ_m/σ_i ($\times 10^{-3}$)
14.9	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.10
27.1	0.39 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.54 ± 0.15
58.2	1.01 ± 0.14	0.73 ± 0.10	0.72 ± 0.20
96.0	3.45 ± 0.50	1.26 ± 0.20	0.37 ± 0.11
120.0	4.37 ± 0.59	1.02 ± 0.14	0.23 ± 0.06

粒子的致突变能力。不同 LET C 离子辐照粘红酵母菌后得到的失活截面、突变截面及 σ_m/σ_i (见表 2)。由 σ_m/σ_i 值可以看出，C 离子的致突变能力在 LET 为 58.2 keV/μm 最大，这比引起最大失活截面和最大突变截面的 LET 值都要小。

4 讨论

从失活截面的结果可以看出，失活效应随 LET 值的增加而增加并逐步达到饱和，这可以用粒子能量的空间分布特点来解释。高能粒子的 LET 小，单位长度上发生电离事件的机率小且分布均匀。随着带电粒子入射深度的增加，粒子能量逐渐降低，LET 增大，电离事件发生的机率逐渐增加并最终达到饱和^[12]。有报道表明，对大肠杆菌 *Escherichia coli* 来说，失活截面在 LET 高于 100 keV/μm 后达到饱和，并接近于大肠杆菌的几何截面 ($\approx 0.3 \mu\text{m}^2$)^[13]。对哺乳动物细胞来说，最大失活截面则接近细胞的平均核截面^[14]。在我们的实验里，粘红酵母菌的 σ_i -LET 效应曲线在 LET 为 120.0 keV/μm 时达到最大值，并与酵母单细胞的平均细胞核截面接近，与类似的文献报道基本一致。

从突变截面与 LET 值的关系可以看出，突变截面在 LET 为 96.0 keV/μm 时达到最大值，之后随 LET 值的升高表现出下降的趋势。这提示着诱导 DNA 分子发生突变损伤效应的碳离子束存在一个最佳的能量区域值，这一能量区域所对应的 LET 值足以引起 DNA 发生突变损伤，但不会造成过多的细胞死亡。虽然高 LET 能使细胞失活效应增大，但由于突变效应只能表现在存活下来的细胞中，过多的细胞死亡反而会降低突变比率，因此 C 离子只有具有适宜的 LET 值才能在酵母细胞中引起最高的突变率。有报道称，80 MeV/u 的 C 离子造成的番茄种子染色体畸变率随 LET 的变化表现出 4 倍以上的差异^[15]。对于比较轻的氦离子来说，大肠杆菌乳糖操纵子在 LET 20 keV/μm 时表现出较高的突变率^[8]。很难比较这些用不同的材料和粒子得到的结果。就我们的实验结果来看，C 离子在 LET 58.2 keV/μm 时的诱变能力最强，此时所对应的 C 离子能量约为 35 MeV/u。

总之，粘红酵母菌在受到不同 LET C 离子照射以后，细胞失活效应和突变效应表现出很强的 LET 依赖性：最大失活截面在 LET 为 120.0

突变截面和失活截面的比值 (σ_m/σ_i) 可以反映

keV/ μm 时饱和并达到最大, 突变截面则在 LET 为 96.0 keV/ μm 时达到最大; 通过对致突变能力 (σ_m/σ_i) 的分析发现, 经辐照后存活下来的粘红酵母菌 C 离子的最大致突变能力体现在 LET 为 58.2 keV/ μm 时。这些结果表明, C 离子对粘红酵母菌的最佳致死效应和最佳致突变效应存在于不同的能量区域。这对辐射生物基础研究领域、重离子辐照微生物诱变育种及空间高能离子的致突变能力评估都有重要的参考价值。

参考文献 (References):

- [1] Mao Shuhong, Jin Genming, Wei Zengquan. Nuclear Techniques, 2005, **28**(11): 845(in Chinese).
(毛淑红, 靳根明, 卫增泉. 核技术, 2005, **28**(11): 845.)
- [2] Ma Shuang, Li Wenjian, Wang Jufang. Acta Biophysica Sinica, 2009, **9**(11): 500(in Chinese).
(马爽, 李文建, 王菊芳. 生物物理学报, 2009, **9**(11): 500.)
- [3] Guo C L, Wang J F, Jin X D. Nucl Instr and Meth, 2007, **B259**: 997.
- [4] Jing X, Li W, Wang Z, *et al.* Nucl Instr and Meth, 2009,

- B267**: 1837.
- [5] Tokarova B, Amirtayev K G, Kozubek S, *et al.* Mutat Res, 1989, **227**: 199.
- [6] Kiefer J. Advances in Space Research, 1994, **14**: 331.
- [7] Baltschukat K, Horneck G. Radiat Environ Biophys, 1991, **30**: 87.
- [8] Kozubek S, Ryznar L, Horneck Horneck G. Mutat Res, 1994, **309**: 17.
- [9] Kiefer J. Advances in Space Research, 2004, **34**: 1278.
- [10] He Haiyan, Tan Yongling, Tan Yongrong. Cereal and Feed Industry, 2008, (10): 29(in Chinese).
(何海燕, 覃拥灵, 覃勇荣. 粮食与饲料工业, 2008, (10): 29.)
- [11] Wang J F, Li R M, Guo C L, *et al.* Radiat Res, 2008, **49**: 391.
- [12] Kraft G. Progress in Particle and Nuclear Physics, 2000, **S473**: 45.
- [13] Kozubek S, Ryznar L, Horneck G. Mutat. Res, 1994, **309**: 17.
- [14] Weyrather W K, Ritter S, Scholz M, *et al.* Int J Radiat Biol, 1999, **75**: 1357.
- [15] Wang J, Li W, Zhang Y. Plasma Science and Technology, 2008, **10**: 270.

Analysis of Mutagenic Effects Induced by Carbon Beams at Different LET in a Red Yeast Strain^{*}

SUN Hai-ning^{1, 2}, WANG Ju-fang^{2, #}, MA Shuang², LU Dong², WU Xin², LI Wen-jian²

(1 School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To evaluate inactive and mutagenic effects of carbon beam at different LET, the inactivation cross section and mutation cross section induced by carbon beams of different LET values were investigated in a red yeast strain *Rhodotorula glutinis* AY 91015. It was found that the maximum inactivation cross section of 4.37 μm^2 , which was very close to the average nucleus cross section, was at LET of 120.0 keV/ μm . The maximum mutation cross section was at LET of 96.0 keV/ μm . Meanwhile, the highest mutagenicity of carbon ion was found around 58.2 keV/ μm . It implied that the most efficient LET to induce mutation in survival yeasts was 58.2 keV/ μm , which corresponded to energy of 35 MeV/u carbon beam. The most effective carbon beam to induce inactivation and mutation located at different energy region.

Key words: carbon beam; linear energy transfer; inactive effect; mutagenic effect; red yeast

* Received date: 13 May 2010; Revised date: 1 Jun. 2010

* Foundation item: Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences(KJCX2-YW-N34-2); Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences(Y006060XBO)

Corresponding author: Wang Ju-fang, E-mail: jufangwang@impcas.ac.cn