

①

99, 22(3)
第22卷 第3期
1999年3月

129-132

核 技 术
NUCLEAR TECHNIQUESVol. 22, No. 3
March, 1999

离子注入微生物产生“马鞍型”存活曲线的可能作用机制*

宋道军 姚建铭 邵春林 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

Q691.5

摘要 研究了不同剂量的 N^+ 注入耐辐射异常微球菌(*D. radiodurans*)和大肠杆菌(*E. coli*)的存活与注入剂量的关系。结果表明, 两者的存活曲线随着 N^+ 注入剂量的增加均呈现为先降后升再降的“马鞍型”变化, 完全不同于紫外线和 γ 射线辐射下的“肩形”(*D. radiodurans*)和“直线形”(*E. coli*)。本文根据已有的离子束生物工程学理论对这现象的可能作用机制进行了探讨。

关键词 离子注入, 微生物, 存活剂量关系, 生物学效应

自80年代中期低能重离子生物学研究在我国兴起以来, 离子注入生物学在基础和应用研究上都取得了很大的发展, 并取得了可观的社会效益和经济效益^[1,2]。已有研究表明, 低能重离子注入生物体后, 可产生集能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换四种联合作用为一体的集体生物学效应, 从而产生较高的突变频率和丰富的诱变图谱, 因而其作用过程和作用内容比其它电离辐射更复杂、丰富而广泛。但就离子注入的研究而言, 其基础理论研究还远落后于应用研究, 尤其是在质量沉积效应、动量传递效应和电荷作用效应方面的研究更是如此。有鉴于此, 本文以耐辐射异常微球菌(*D. radiodurans*, G^-)和大肠杆菌(*E. coli*, G^-)为试材, 开展了 N^+ 注入下其存活与剂量关系的研究, 结果发现其存活率随注入剂量的关系呈现为先降后升再降的“马鞍型”变化, 而不象紫外线和 γ 射线辐射那样。这一新的变化曲线尚无法用现有的辐射损伤理论来解释。为加强离子注入生物学的基础理论研究并更好地指导应用研究, 我们开展了离子注入微生物产生“马鞍型”存活曲线的可能作用机制的研究。

1 实验方法

1.1 供试菌种和培养方法

耐辐射异常微球菌(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, 培养温度32℃, pH6.8~7.2; 大肠杆菌(B)生长于LB培养基(胰蛋白胨10g, 酵母膏5g, NaCl 10g, 蒸馏水1000mL)上, pH7.0, 固体培养时加1.5%的琼脂, 摇床培养时, 在200r/min下能良好生长。

1.2 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 CFU/mL)和培养14h的*E. coli*(约含 2×10^9 CFU/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, 自然干燥后立即进行 N^+ 注入。

* 国家自然科学基金项目, No.19605005

收稿日期: 1997-08-12, 修回日期: 1998-06-25

1.3 N^+ 注入处理

离子注入在本所低能离子注入机上进行, 能量为20keV, 剂量为 $0-10^{16}/\text{cm}^2$, 注入靶室的真空度为 10^{-3}Pa , 采用脉冲注入, 每个脉冲5s, 间隔为30—50s, 以消除大剂量下热效应可能产生的负作用。

1.4 N^+ 注入后的培养

N^+ 注入后立即将玻璃片在无菌操作下从皿中取出, 放入含有10mL无菌水的摇瓶中, 在200r/min下摇洗20min, 再根据不同注入剂量对细胞的可能损伤情况, 适当稀释后涂平板

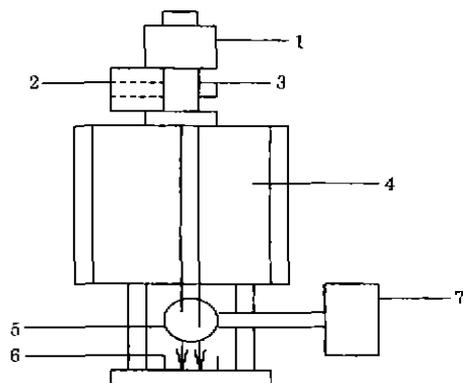


图1 离子束辐照装置简图

1. 离子源, 2. 分子泵, 3. 进气口, 4. 真空室, 5. 感应圈, 6. 靶室, 7. 束流积分仪

Fig.1 Sketch of the ion beam irradiation installation

1. Ion source, 2. Molecular pump, 3. Gas inlet, 4. Vacuum chamber, 5. Induction coil, 6. Target chamber, 7. Ion beam integrator

培养, 以每皿生长出100左右的菌落为宜, 然后按1.1所述的条件下培养3d后对菌落进行计数统计。

1.5 离子束辐照装置

本研究所用离子束辐照装置见图1。它是一台小型 ECR(Electron cyclotron resonance)离子源, 该离子源不存在易损坏的热灯丝, 具有壁溅射低、离化率高、工作寿命长以及能获得高密度氧化性离子流等特点。本装置利用波导直接输入的方式, 放电室尺寸远小于TE或TM谐振模式的等离子体。

实验过程中离子束流剂量的测定采用感应圈外接离子束流积分仪和剂量设置自动控制的高灵敏度、高精度的测试手段, 使得剂量测定误差严格控制在 $10^{14} \pm 10^3/\text{cm}^2$ 范围

2 实验结果

不同剂量的 N^+ 注入下耐辐射异常球菌和大肠杆菌的存活变化见图2, 从图2可以看出, 当 N^+ 的注入剂量较小时, *D.radiodurans*的存活率随注入剂量的增大而迅速下降, 之后随着注入剂量的增大, 其存活率又逐渐上升, 当达到一定剂量后, 其存活率又逐渐下降, 即整个存活曲线呈现为先降后升再降的“马鞍型”曲线变化, 这与紫外线和 γ 射线辐照下的“肩型”曲线截然不同^[3]。

由图2还可知, 不同剂量的 N^+ 注入对*E.coli*存活率的影响与*D.radiodurans*的情况相似, 也呈现出“马鞍型”的变化规律, 只是两种情况下存活曲线的谷值和峰值所对应的注入剂量值有所不同而已, 而*E.coli*在紫外线和 γ

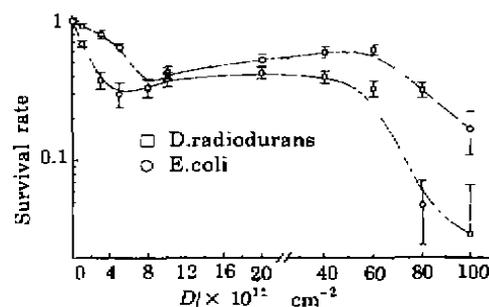


图2 N^+ 注入下耐辐射异常球菌和大肠杆菌的存活变化

Fig.2 Variations of survival of *D.radiodurans* and *E.coli* with N^+ implanted dose

射线辐照下的存活曲线为“直线型”^[3]。

综合我们对D.radiodurans和E.coli两种不同种类的菌的研究结果可以看出,离子注入条件下其存活曲线与紫外线和 γ 射线辐照下的存活曲线有所不同,充分说明了离子注入与其他电离辐射在作用机制上存在着重大差异。

3 讨论

3.1 对在低剂量 N^+ 注入下D.radiodurans和E.coli存活曲线的可能解释

当 N^+ 的注入剂量较小时,D.radiodurans和E.coli的存活曲线均随着注入剂量的增大而降低。可以认为,在这一剂量范围内造成两者存活率下降的主要原因是能量沉积效应和动量传递效应综合作用的结果,因为这种小剂量下低能 N^+ 的直接作用可导致DNA的损伤^[4,5],能量沉积所产生的大量自由基亦会导致DNA和生物膜等其它生物大分子的损伤^[6],从而都造成存活率下降。由于小剂量下注入离子的电荷积累较少,因此这种情况下电荷的作用效应可能是次要的。

3.2 对在中高剂量 N^+ 注入下D.radiodurans和E.coli存活曲线的可能解释

对于在中高剂量 N^+ 注入下D.radiodurans和E.coli存活率随着注入剂量的增大而上升但仍远低于对照这一现象,一方面说明能量沉积和动量传递效应所造成的损伤仍起主要作用,另一方面则说明注入 N^+ 的电荷积累可能发挥了作用。这可从下列几个方面说明:(1)大量连续注入电荷的堆积会产生很强的库仑斥力,这种库仑斥力能对被注入细胞形成一个“保护屏障”,阻碍后续注入离子对细胞的损伤,从而达到对细胞的保护作用;(2)大量堆积的电荷可形成一个弱电场,这种电场的刺激效应可以激活D.radiodurans和E.coli体内的各种酶,尤其是修复酶,从而提高了损伤修复的效率,因为许多研究^[7-9]都指出,适量的电荷(场)作用对生物体的生长和发育具有明显的刺激作用;(3)注入到细胞内的电荷影响其生命过程中的基因调控,可能诱导新的修复机制产生,从而提高其存活率。

此外,离子注入的质量沉积也可生成新的产物^[10],这些产物能与细胞内的DNA和蛋白质等生物大分子竞争自由基,从而减轻自由基对细胞的损伤作用,这也可能是中高剂量下两种微生物存活率升高的原因之一。而在小剂量下,由于这种质量沉积产物较少,对存活率升高的影响就不明显。

3.3 高剂量注入对D.radiodurans和E.coli存活的影响

当 N^+ 的注入剂量继续增大时,其存活率又逐渐下降,说明大剂量注入下能量沉积和动量传递所造成的DNA和生物膜等其他生物大分子的严重损伤已超出了其所具有的修复能力;而且在这种情况下,大量堆积的电荷达到一定的临界值后会产生库仑爆炸,其形成的“保护屏障”作用也就不再存在了,因此存活率又迅速降低。

4 结语

我们得到了 N^+ 注入下D.radiodurans和E.coli的存活曲线与紫外线和 γ 射线辐照下的存活曲线不同的结论,文献[11,12]也报道过这样的变化规律,这些都说明离子注入的作用机制不同于其它电离辐射的作用机制。

还需指出的是, N^+ 注入下D.radiodurans和E.coli的“马鞍型”存活曲线亦可能是由于离

子注入下诱导产生的新辐射损伤修复机制作用的结果,但这种新的辐射损伤修复机制到底是否存在?如果存在,它的作用原理又是怎样的?这将是我们要开展的研究工作内容之一。

参 考 文 献

- 1 余增亮,江泽慧,杨剑波,等.安徽农业大学学报(第二次全国离子注入生物学效应学术会议专辑),1994,21(3):221-349
- 2 余增亮.物理,1997,26(6):333-338
- 3 宋道军,余增亮.生物物理学报,1998,14(1):185-188
- 4 Gutman P D. Gene, 1994, 1:31-37
- 5 宋道军,余增亮.生物化学与生物物理学报,1998,30(6):570-574
- 6 宋道军,余增亮.生物物理学报,1998,14(2):343-348
- 7 马志章.细胞生物学杂志,1997,18(3):111-114
- 8 Jacob H E, *et al.* Microbiol, 1980, 21:225-231
- 9 Jacob H E, *et al.* Proc 19th Hungarian Ann Meet Biochem Budapest, 1979, 69-78
- 10 邵春林,余增亮.核技术,1997,20(2):70-73
- 11 邵春林,余增亮.核技术,1996,19(6):321-325
- 12 王立秋.河北农业大学学报,1994,17(4):95-99

A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N^+ ions

SONG Daojun YAO Jianming SHAO Chunlin YU Zengliang

(*Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031*)

Abstract

The relations between the survival and dose of *D. radiodurans* and *E. coli* by N^+ ion implantation were investigated. Two curves of survival all take a "saddle shape" with increasing N^+ ion implanted doses, and these are essentially different from the results of UV and γ -ray irradiation. Since the existing theory can not explain this "saddle shape" curve, a possible and reasonable explanation is put forward, based on the energy and momentum deposition effect for lower doses and the charge stimulating effect for higher doses.

Key words Ion implantation, Microorganism, Survival-dose relation, Biological effects