

类胡萝卜素在耐辐射奇球菌辐射抗性中的作用*

杨 桥^{1, 2)} 张晓玲³⁾ 张 磊²⁾ 代 俊²⁾ 张俊祥²⁾ 焦炳华^{1)**}⁽¹⁾第二军医大学生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; ⁽²⁾病毒学国家重点实验室, 武汉大学生命科学院, 武汉 430072;⁽³⁾中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要 为研究耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)中类胡萝卜素的生化合成基因及其在该细菌抗辐射机制中的生物学作用, 通过有机溶剂提取及 LC-MS 技术分析了 *D. radiodurans* 所产类胡萝卜素物质的主要组分, 运用 PCR 及基因同源重组技术, 对该菌中类胡萝卜素生化合成途径的八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, crtB)及八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, crtI)基因进行了缺失突变, 通过表型观察及 HPLC 定量分析突变株所产类胡萝卜素的组分变化确证突变株构建成功. 野生株及 crtB 与 crtI 基因缺失突变株对电离辐射和 H₂O₂ 的敏感性差异比较分析显示, 和野生株相比, 两种突变株对不同剂量电离辐射和不同浓度 H₂O₂ 的敏感性更强. crtB 及 crtI 基因功能研究表明, 这两个关键性合成基因的缺失, 导致突变株不能催化合成类胡萝卜素生化合成途径中的重要中间体——番茄红素及一系列下游产物. 通过 λ 原噬菌体紫外线诱导系统、电子自旋共振(ESR)及 DMPO 自旋捕集技术, 分别在体内和体外评价了其类胡萝卜素的抗氧化能力. 结果表明, 两种类胡萝卜素对超氧阴离子(O₂⁻)及羟自由基(•OH)均表现出较强的清除作用. 上述研究结果为探究 *D. radiodurans* 的类胡萝卜素合成基因和生物学功能, 及类胡萝卜素在 *D. radiodurans* 抗辐射机制中的作用提供了新的直接实验证据.

关键词 耐辐射奇球菌, 类胡萝卜素, 抗辐射, 自由基**学科分类号** Q93**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00689

耐辐射奇球菌 *Deinococcus radiodurans* 属异常球菌科(Deinococcaceae)异常球菌属(Deinococcus), 该菌对电离辐射(存活最高剂量约 15 kGy, 抗性比普通真核生物的 1 000 倍)、紫外线、干燥、强氧化剂和某些化学诱变剂显示超乎寻常的抗性^[1, 2]. 双链断裂(double strand breaks, DSB)可导致基因组上某段基因的缺失, 从而导致一些重要遗传信息的丢失, 被认为是 DNA 损伤的最致命形式. 尽管所有生物体都具有 DNA 修复机制, 但是大多数生物体只能修复其中的一些 DSB, 而 *D. radiodurans* 可在遭受大剂量辐射后 2 h 内即完全修复断裂的基因组^[2]. 这种极强抗辐射能力被认为与其本身具有完善而高效的 DNA 修复系统有关, 但具体的 DNA 修复机理和抗辐射分子机制还未得到完全阐明^[3].

D. radiodurans R1 菌株的全基因组序列于 1999 年公布^[4]. 人类已经开展了利用 *D. radiodurans* 的超强抗辐射特性, 对世界各地放射性地区的重金属污染进行生物修复的研究工作^[5, 6]. 尽管关于 *D. radiodurans* 抗辐射机制的研究已取得了较大进展, 但目前的研究结果还远未能解释其超强抗辐射

机制^[7, 8]. 国内外学者的研究工作大多侧重于其 DNA 修复基因和修复蛋白质方面. 值得注意的是, 该菌因可产生类胡萝卜素物质而菌体呈红色, 而类胡萝卜素是一类多功能的生物活性分子, 是优良的自由基清除剂和抗氧化剂^[9]. 目前, 关于类胡萝卜素在 *D. radiodurans* 超强抗辐射中的作用机制的研究工作还鲜有报道^[9, 10].

本文为研究 *D. radiodurans* 中类胡萝卜素的生化合成基因及其在该菌抗辐射机制中的生物学作用, 通过有机溶剂提取及 LC-MS 技术分析了其类胡萝卜素物质的成分, 利用 PCR 及基因同源重组技术, 构建了类胡萝卜素生化合成途径中的八氢番茄红素合成酶(crtB)及八氢番茄红素脱氢酶(crtI)基

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2007AA091501, 2006AA09Z416, 2006AA09Z425)和中国博士后科学基金资助项目(20080431365).

** 通讯联系人.

Tel: 021-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

收稿日期: 2008-10-09, 接受日期: 2008-11-25

因进行缺失突变, 比较了野生株及突变株对电离辐射和 H_2O_2 的敏感性差异, 并在体内和体外评价了类胡萝卜素的自由基清除及抗氧化能力. 为探究类胡萝卜素合成途径的基因与功能及类胡萝卜素在 *D. radiodurans* 抗辐射机制中的作用提供了新的直接实验证据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基. 耐辐射奇球菌 *D. radiodurans* R1, 大肠杆菌 DH-5 α , 带 λ 噬菌体的大肠杆菌 *E. coli* κ 12 (λ^+)均由中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 提供. 细菌培养用 LB 培养基: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 0.5% 氯化钠, pH 7.2. TGY 培养基: 0.5% 蛋白胨, 0.3% 酵母提取物, 0.1% 葡萄糖, pH 7.2.

1.1.2 试剂. ESR 自旋捕集剂 DMPO(5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide), 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 配制成 0.8 mol/L 浓度, 使用活性炭纯化后置 -20°C 保存备用. 本实验所用 TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶及 DNA Marker 均购自大连宝生生物公司 (TaKaRa), 氨基青霉素和卡那霉素购自美国 Cayman Chemical 公司. PCR-Blunt(Kmr)克隆载体购自美国 Invitrogen 公司. T4DNA 连接酶, 质粒抽提试剂盒、PCR 纯化和胶回收试剂盒购自美国 Promega 公司. 引物合成和 DNA 测序反应均由上海英杰 (Invitrogen) 生命技术有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 类胡萝卜素的提取及 LC-MS 分析.

类胡萝卜素的提取: 取对数生长期中后期的菌液 200 ml, 4 000 g 离心 20 min, 去离子水洗 3 次, 细菌沉淀用 10 ml 冰预冷的丙酮: 甲醇溶液 (3: 2) 抽提, 4°C 避光低速振荡 20 min, 4°C , 10 000 g 离心 20 min, 取上清, 菌体沉淀重复上述抽提过程 3 次至上清无色, 合并抽提液, 30°C 下旋转蒸发至干, 充入纯度为 99.99% 的氩气, 置 -80°C 保存, 或溶解于 1 ml 流动相, 经 0.22 μm 滤膜过滤后直接进样进行 HPLC 及 LC-MS 分析.

LC-MS 分析: 美国 Thermo Electron 公司 Finnigan LCQ Deca XP MAX 液-质联用仪, 配置 Finnigan Surveyor 系列高效液相色谱仪, LightPipe™ 二极管阵列 (PDA) 检测器. Finnigan 多级离子阱质谱仪, 配置大气压化学电离 (APCI) 源. 色谱条件: Waters ODS 反相 C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$

250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈: 甲醇: 二氯甲烷 (85: 10: 5), 检测波长为 470 nm, 流速 0.2 ml/min, 进样量 10 μl . 质谱条件: 正离子 (+) 检测, 离子源喷射电压为 4.2 kV, 毛细管温度为 250°C , 干燥气流速为 6.0 ml/min, 鞘气 (N_2) 流速为 1.05 L/min, 辅助气流速为 0.16 L/min. 数据采集方式: 在 m/z 20~2000 范围内进行全扫描. 仪器控制及数据分析: Finnigan Xcalibur™ (Version 2.0) 软件.

1.2.2 *ctrB* 及 *ctrI* 基因缺失突变株的构建及鉴定. 突变株的构建: 参照文献 [5] 提取 *D. radiodurans* R1 基因组 DNA, 以此为模板扩增目的基因序列. 其中用于扩增 *ctrB* 基因 (DR0862) 的引物为 *ctrB*-F, 5' TATCCATTATCGCAACTGTTTTCGC 3', 及 *ctrB*-R, 5' GTATAGTGACAGGCCGTATTCGTCG 3'. 扩增产物长度 516 bp, 位于 *ctrB* 蛋白密码子 54 到 225 之间. 扩增 *ctrI* 基因 (DR0861) 引物为 *ctrI*-F, 5' CATTTAGTTCGGGTCAAGGAGGGCG 3', 及 *ctrI*-R, 5' CTTGGTTGGGATGTTGTGGTGCTTG 3'. 扩增产物长度为 825 bp, 位于 *ctrB* 蛋白密码子 103 到 377 之间. 扩增的 PCR 产物经钝端克隆到 PCR-Blunt 载体 (Kmr) 中, 然后通过单交换同源重组的方式重组入 *D. radiodurans* R1 基因组中. 转化实验参照文献 [11] 所述方法. 培养 R1 单菌落至对数生长期, 使用含 30 mmol/L $CaCl_2$ 的 TGY 培养基培养菌株 2 h 后使其处于感受态, 加入含抗性基因的 PCR 产物, 30°C 培养 36 h, 以 25 mg/L 卡那霉素筛选得到 *ctrB* 及 *ctrI* 基因缺陷突变株 MB-10 及 MI-21.

突变株的鉴定: 待 TGY 抗性平板上长出相应的突变菌落后, 挑取单菌落培养至对数生长期, 提取基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 分别以 *ctrB* 及 *ctrI* 基因上述对应引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经凝胶回收后送上海英杰生命技术有限公司测序, 比对其序列后确定其是否为相应的基因缺失突变株.

1.2.3 突变株对电离辐射及 H_2O_2 的敏感性测定. ^{60}Co γ 射线辐照敏感性试验按以下步骤进行: 挑取 R1、MB-10 及 MI-21 菌株的单菌落, 30°C 培养至对数生长期, 适当倍数稀释后悬浮于 10 mmol/L 生理盐水中, 室温, 使用 ^{60}Co γ 射线照射至设定剂量范围 (0~12 kGy). 辐照后取 100 μl 菌液, 稀释涂布于 TGY 平板上, 30°C 培养 48 h 后计数. 以未辐照处理的细菌作为对照组计算其细菌存活率, 每个处理取 3 次试验的平均值. H_2O_2 敏感性试验参照文

献[11]进行。

1.2.4 类胡萝卜素抗氧化能力评价。

a. λ 噬菌体紫外诱导系统(UIB). 类胡萝卜素抗氧化能力评价通过其对 λ 噬菌体紫外诱导系统 (ultraviolet induction of bacteriophage λ , UIB) 测定, 试验方法参照文献[12]进行. 将 37℃ 培养过夜的 *E. coli* κ 12 (λ^+) 培养物按 1:10 的比例转入另一新鲜的 LB 培养基中, 振荡培养 6 h 后, 4 000 g, 4℃ 离心 15 min, 弃上清, 加入 2 ml 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 制成菌悬液. 取 1.5 ml 菌悬液和 0.5 ml 不同浓度的类胡萝卜素溶液, 加入直径 6 cm 培养皿中, 置于 15W 紫外灯 (254 nm, UVC) 下 30 cm 处照射 30 s, 同时以不加胡萝卜素的样品作为对照. 紫外线照射后振荡混匀, 取 100 μ l 涂布 LB 平板, 置 37℃ 暗培养过夜. 根据菌落形成单位 (CFU) 计算抑制率(%): 抑制率=(CFU_{对照}-CFU_{菌样})/CFU_{对照} × 100%.

b. 电子自旋共振(ESR)检测. 德国 BRUKER 公司 ESP300 型电子自旋共振波谱仪. ESR 检测条件: 中心磁场 3 420 G, 微波功率 10 mW, 扫场宽度 100 G, 调制频率 25 Hz, 调制幅度 0.5 mT, 响应时间 81.92 ms, 增益 2, 仪器操作温度 25℃. 溶源菌系统菌体密度 10⁸ 个/ml. 紫外线照射时间 30 s. 反应体系: 28 μ l 溶源菌(10⁸ 个/ml), 5 μ l DMPO(0.8 mol/L), 5 μ l DETAPAC(1 mol/L), 12 μ l NaCl(0.85%). 全部自旋捕集实验均使用直径 1 mm 的标准石英毛细管.

抗氧化能力计算: UIB 系统主要产生两种类型自由基, 即超氧阴离子(O₂⁻)及羟自由基(•OH), 在上述自由基产生体系中加入不同浓度的 *D. radiodurans* 类胡萝卜素提取液, 同等实验条件下测定其 ESR 波谱强度, 根据所测 ESR 信号强度的衰减率(%)来计算其对自由基清除能力.

1.2.5 统计分析. 所有结果都以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 数据统计分析使用 SPSS 软件(Version 11.0)和 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著差异.

2 结 果

2.1 *D. radiodurans* 类胡萝卜素的 LC-MS 分析

D. radiodurans 中所产类胡萝卜素含量最高的成分为 deinoxanthin ((all-E)-2, 1'-dihydroxy-3'-4'-didehydro-1', 2'-dihydro- β , ψ -carotene-4-one), 分子式为 C₄₀H₅₄O₃, 含 2 个羟基及 1 个羰基^[13, 14]. 其化学结构如图 1. 但本文根据其培养物提取物

LC-MS 分析的紫外可见吸收光谱数据, 结合物化性质测定结果并参考文献报道的类胡萝卜素特征性吸收谱图, 发现含量较高的成分还包括化学结构待定的另一种类胡萝卜素(图 1), LC-MS 分析显示其分子质量为 566.26 u. 推测的分子式为 C₄₀H₅₄O₂. 根据两化合物的峰面积的积分结果, 两者含量分别占总量的 46%和 38%.

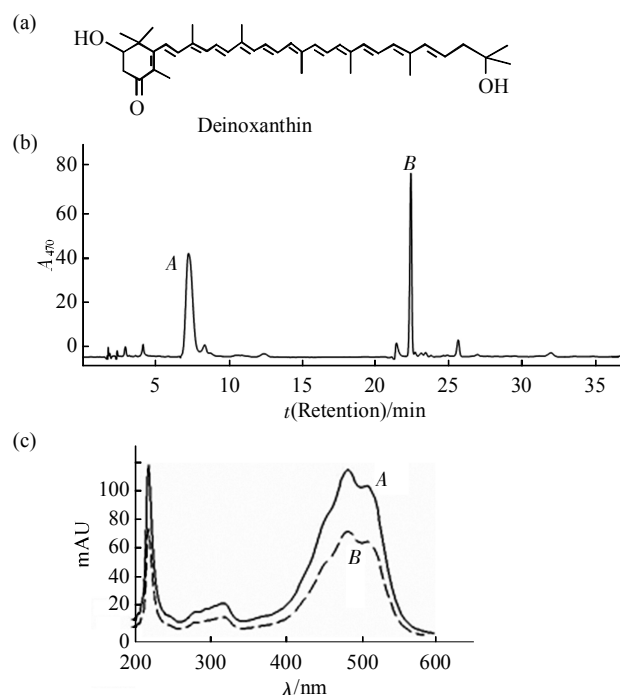


Fig. 1 HPLC profile of *D. radiodurans* carotenoids and UV-vis data of two main carotenoids

A: Deinoxanthin; B: Unidentified carotenoid. (a) The chemical structure of deinoxanthin. (b) HPLC chromatography. (c) UV-vis data of two main carotenoids.

2.2 *D. radiodurans* *ctrB* 及 *ctrI* 基因缺失突变株的构建

八氢番茄红素合成酶(*crtB*)是 *D. radiodurans* 类胡萝卜素生化合成途径中的第一个限速酶(图 2), 它催化含 20 碳的牻牛儿基牻牛儿基二磷酸(GGDP) 转化成无色的八氢番茄红素(phytone), 而后者在 八氢番茄红素脱氢酶(*crtI*)的催化下, 经数步脱氢反应生成红色的重要中间前体——番茄红素(lycopene)^[15]. 而番茄红素是类胡萝卜素进一步合成代谢的重要分枝点, 其可经后续的一系列生化反应, 最终合成终产物 deinoxanthin. 本文通过 PCR 反应分别扩增到了 *D. radiodurans* 中的 *crtB* 及 *crtI* 两个基因片段 (图 3), 并通过基因同源重组的方式重组到该菌基因组 DNA 中, 通过抗性筛选到了两

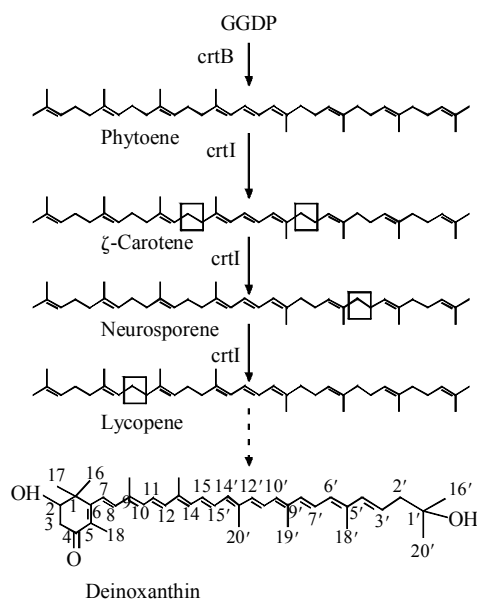


Fig. 2 Presumed carotenoid biosynthesis pathways in *D. radiodurans*

Terminal products of biosynthesis routes are shown. GGDP: Geranylgeranyl diphosphate; crtB, phytoene synthase; crtI, phytoene desaturase.

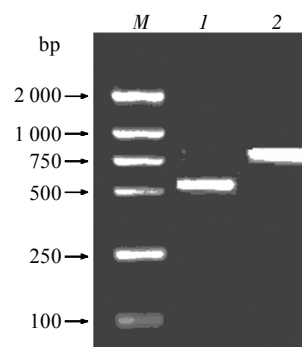


Fig. 3 PCR results of *crtB* and *crtI* genes in *D. radiodurans*

M: DNA marker DL2000; *1*: *crtB* gene; *2*: *crtI* gene.

个基因的突变株. 突变株的表型观察显示, *crtB* 及 *crtI* 基因的完全缺失会导致红色野生型菌株转变为完全无色的突变株. 通过进一步对野生型、*crtB* 及 *crtI* 基因缺失突变株 MB-10 及 MI-21 株所产类胡萝卜素的 HPLC 比较分析可知(图 4), 与野生型相比, MB-10 及 MI-21 的主要红色类胡萝卜素色谱峰均完全消失, 这与突变株的表型变化完全一致, 确证了 *D. radiodurans crtB* 及 *crtI* 基因缺失突变株构建成功.

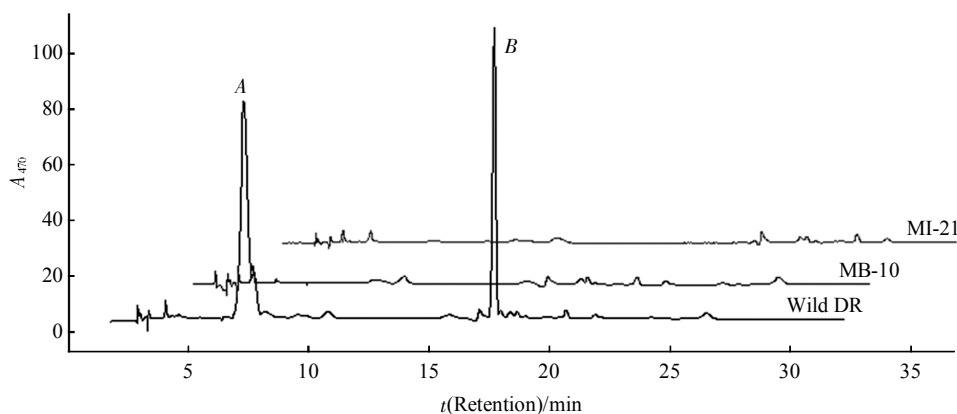


Fig. 4 HPLC profile of the carotenoids extracted from the cell cultures of wild R1, *crtB* and *crtI* deletion mutants of *D. radiodurans*

A: Deinoxanthin; *B*: Unidentified carotenoid.

2.3 野生型菌株和突变株对 γ 射线及 H_2O_2 敏感性的比较

D. radiodurans 野生型, *crtB* 及 *crtI* 基因缺失突变株 MB-10 及 MI-21 株在不同辐照剂量下的细胞存活率见图 5a. 野生型 R1 具有极强的辐射抗性, 其存活曲线呈典型的肩形曲线, 剂量小于 4 000 Gy 其存活率高于 93%. 而基因功能缺陷株 MB-10 及 MI-21 对辐射比较敏感, 呈现出与 R1 截然不同的存活曲线. MB-10 及 MB-21 两者之间的存活率曲

线则十分相似, 在 4 000 Gy 剂量下仅有约 23% 左右的存活率. 高剂量下 (> 6 000 Gy), 两个突变株对辐射较野生型 R1 更敏感. 野生型与两个突变株对 H_2O_2 的敏感性曲线与 γ 射线的非常相似(图 5b). 因此, 可初步推测 *crtB* 及 *crtI* 基因在耐辐射奇球菌辐射抗性中发挥着重要作用, 其作用机制可能为 *crtB* 及 *crtI* 基因的缺失突变导致突变株不能催化类胡萝卜素生化合成重要中间体番茄红素及下游一系列产物. 类胡萝卜素的独特共轭双键及功能性取代

基结构所具有的超强自由基清除能力,可中和或清除 γ 射线辐照所诱导产生的大量毒性自由基,从而可有效减缓辐照所引发的对生物大分子(核酸、

蛋白质、脂、糖)及细胞超微结构的氧化性损伤,最终提高细胞存活率[7, 10, 16~18]。

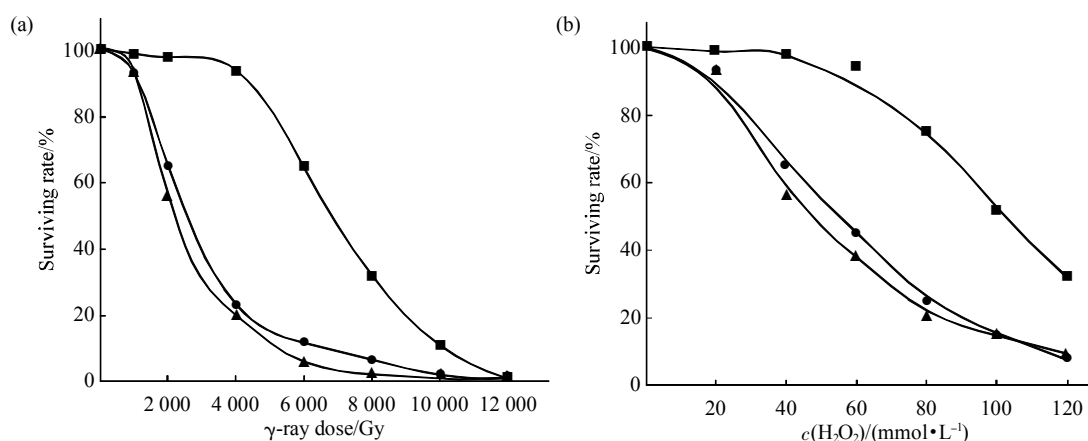


Fig. 5 Comparisons of sensitivity of wild *D. radiodurans*, *ctrB* and *ctrI* deletion mutants to γ -irradiation (a) and H_2O_2 (b)

■—■: Wild R1; ●—●: MB-10(*ctrB*); ▲—▲: MI-21(*ctrI*).

2.4 类胡萝卜素抗氧化能力评价

为进一步验证类胡萝卜素在 *D. radiodurans* 超强辐射抗性中的作用与其抗氧化能力的相关性,首先利用建立的抗氧化能力生物学评价模型—— λ 原噬菌体紫外诱导系统 (UIB), 在体内评价 *D. radiodurans* 类胡萝卜素粗提物及两种主组分对自由基的清除作用. UIB 系统主要产生超氧阴离子 (O_2^-) 及羟自由基 ($\cdot\text{OH}$), 而这两种类型自由基正是

γ 射线辐射在细菌体内诱发产生的主要的自由基类型[7, 12]. 利用 UIB 系统可在一定程度上模拟 γ 射线辐射所导致的细菌体内自由基诱发及其损伤效应. UIB 抑制率的计算结果如图 6 a 所示, 可见粗提物和组分 A 和 B 都表现出了明显抑制作用. 其作用效果强弱顺序为: A+B > B > A > 粗提物.

电子自旋共振 (ESR) 和自旋探针捕获技术 (spin trapping technique) 是最直接、最有效的检测自由基

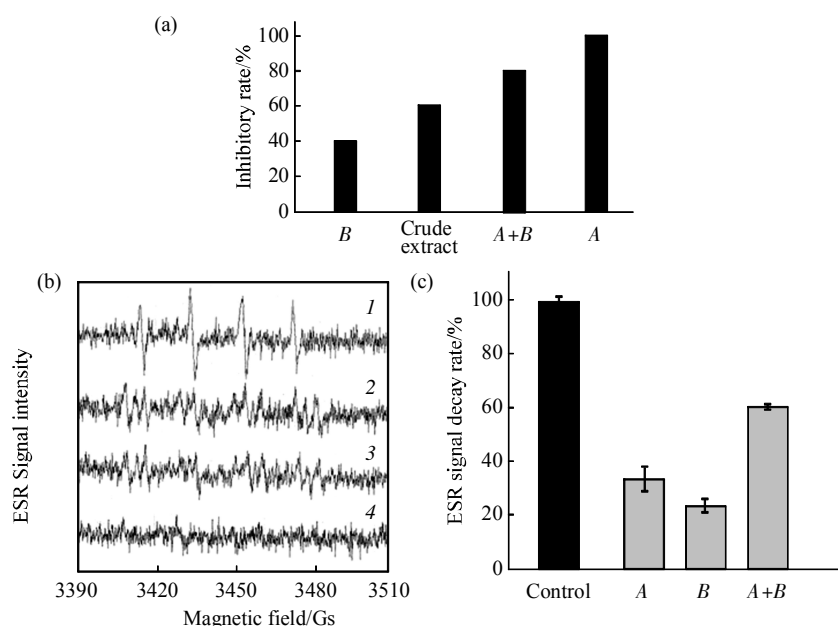


Fig. 6 The inhibitory effects of *D. radiodurans* carotenoids on UIB system and the free radical scavenging capacities measured by ESR spin trapping technique

(a) Measured by UIB system. (a) and (c) A: Deinoxanthin; B: Unidentified carotenoid. (b) Measured by ESR technique. 1: UIB+UV; 2: UIB+UV+deinoxanthin; 3: UIB+UV+B; 4: UIB+UV+(deinoxanthin and B). (c) Quantitative results of ESR.

的方法^[9]. 本实验利用该技术, 不仅直观观察到了 UIB 系统产生的复杂自由基信号, 而且在体外定量测定了 *D. radiodurans* 类胡萝卜素成分对该系统产生自由基的清除作用. λ 原噬菌体经紫外线照射, 产生了较强的自由基信号(图 6b, 1), 加入 *D. radiodurans* 的类胡萝卜素后, 自由基信号强度明显降低(图 6b, 2, 3, 4). 两种类胡萝卜素共同作用及单独作用, 对 ESR 检测的自由基信号的衰减率分别为 60%、32%和 22%(图 6c). ESR 测定结果与对 UIB 系统抑制效果的测定结果完全一致, 进一步确证了 *D. radiodurans* 类胡萝卜素对 O_2^- 及 $\bullet OH$ 具有较强的清除能力. 上述结果表明, 类胡萝卜素物质在该菌辐射抗性中的作用与其强自由基清除能力密切相关.

3 讨 论

经过多年的研究, 科学家们目前认为 *D. radiodurans* 的辐射保护机制主要有以下几个方面. 首先, 其具有高效的 DNA 修复系统, 可快速高效地对损伤的 DNA 进行修复. 其次, 细菌体内存在着超氧化物酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化保护酶系相关基因的高水平表达, 它们在细菌的氧化损伤防御机制中发挥着重要作用. 其三, 细菌细胞壁由数层致密结构组成, 复杂的外膜脂质和较厚的富含氨基酸的肽聚糖层, 可减缓菌体遭受致死剂量辐射所引起的损伤^[2~4, 7~10].

D. radiodurans 随着生长时间的不断延长, 细菌类胡萝卜素积累呈增长趋势, 稳定期细胞色素积累达到最大值, 该时期细菌抗辐射能力也最强. 且 *D. radiodurans* 类胡萝卜素合成 *crtB* 及 *crtI* 基因缺失突变株对电离辐射及 H_2O_2 的抗性和野生型相比显著降低. 表明在决定 *D. radiodurans* 抗性的众多因素中, 类胡萝卜素起着重要作用. 作为其细胞膜结构的脂质成分, 类胡萝卜素的强自由基清除和抗氧化作用, 在细菌应对辐射等因素所诱导的活性氧损伤的防御体系中发挥着重要作用. 类胡萝卜素独特的长链共轭双键结构的分子长度与细胞膜磷脂双分子层的厚度相当, 且其分子在膜中的方向垂直于细胞膜平面, 这样其共轭双键结构可迅速捕获并中和侵入质膜中任何深度的有害自由基^[10].

目前, *D. radiodurans* 中类胡萝卜素生化合成途径中的类胡萝卜素合成基因还未得到完全鉴定, 本研究构建了该细菌类胡萝卜素生化合成途径中两个关键性基因 *crtB* 及 *crtI* 的基因缺失突变株, 并比

较了野生株及两种突变株对电离辐射及 H_2O_2 的敏感性差异, 对 *crtB* 及 *crtI* 基因的生物功能进行了初步研究, 并通过体内和体外两种系统评价了类胡萝卜素的自由基清除及抗氧化能力. 类胡萝卜素是 *D. radiodurans* 的主要结构性组成部分并在细胞质内游离存在, 其具有对 γ 射线辐射所诱导产生的两种主要自由基——超氧阴离子(O_2^-)及羟自由基($\bullet OH$)的强清除能力, 从而提高了细菌对自由基介导的氧化损伤的抗性. 该发现是对现有 *D. radiodurans* 辐射抗性机制的一个新的重要补充, 并为进一步探究类胡萝卜素的生物合成基因与生物功能, 及类胡萝卜素在 *D. radiodurans* 超强辐射抗性中的作用及其实际应用奠定了良好的工作基础.

感谢 衷心感谢中国科学院生物物理研究所赵保路研究员及其课题组成员, 中国军事医学科学院国家生物医学分析中心自由基与顺磁共振实验室吴可研究员、丛建波高级工程师在 ESR 实验及波谱解析方面给予的无私帮助.

参 考 文 献

- 1 Anderson A W, Nordan H C, Cain R F, *et al.* Studies on a radio-resistant micrococcus: isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol*, 1956, **10**: 575~578
- 2 Battista J R. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu Rev Microbiol*, 1997, **51**: 203~220
- 3 Cox M M, Battista J R. *Deinococcus radiodurans*-the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(11): 882~892
- 4 White O, Eisen J A, Heidelberg J F, *et al.* Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 1999, **286**(5444): 1570~1577
- 5 Lange C C, Wackett L P, Minton K W, *et al.* Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(10): 929~933
- 6 Brim H, McFarlan S C, Fredrickson J K, *et al.* Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(1): 85~90
- 7 Ghosal D, Omelchenko M V, Gaidamakova E K, *et al.* How radiation kills cells: Survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29**(2): 361~375
- 8 Kolari M, Schmidt U, Kuismanen E, *et al.* Firm but slippery attachment of *Deinococcus geothermalis*. *J Bacteriol*, 2002, **184**(9): 2473~2480
- 9 Funayama T, Narumi I, Kikuchi M, *et al.* Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res*, 1999, **435** (2): 151~161
- 10 Carbonneau M A, Melin A M, Perromat A, *et al.* The action of free

- radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. Arch Biochem Biophys, 1989, **275**(1): 244~251
- 11 Markillie L M, Varnum S M, Hradecky P, *et al.* Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*katA*) and superoxide dismutase (*sodA*) mutants. J Bacteriol, 1999, **181**(2): 666~669
 - 12 Yang Q, Zhang X L, Zhang J X, *et al.* A novel method for evaluating free radical scavenging abilities of antioxidants using ultraviolet induction of bacteriophage λ . J Biochem Biophys Methods, 2006, **67**(2~3): 163~171
 - 13 Lemee L, Peuchant E, Clerc M, *et al.* Deinoxanthin: a new carotenoids isolated from *Deinococcus radiodurans*. Tetrahedron, 1997, **53**(3): 919~926
 - 14 杨 桥, 张俊祥, 朱石桥, 等. 耐辐射奇球菌抗辐射物质研究. 分析科学学报, 2004, **20**(5): 465~467
Yang Q, Zhang J X, Zhu S Q, *et al.* J Anal Sci, 2004, **20**(5): 465~467
 - 15 Umeno D, Tobias A V, Arnold F H. Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, **69**(1): 51~78
 - 16 Makarova K, Aravind L, Wolf Y, *et al.* Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, **65**(1): 44~79
 - 17 Trevithick-Sutton C C, Foote C S, Collins M, *et al.* The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: a chemiluminescence and ESR study. Mol Vis, 2005, **12**: 1127~1135
 - 18 Tatsuzawa H, Maruyama T, Misawa N, *et al.* Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli*-attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. FEBS Lett, 2004, **484**(3): 280~284
 - 19 Moan J. Detection of singlet oxygen production by ESR. Nature, 1979, **279**(5712): 450~451

Effects of Carotenoids on The Radioresistance of The Extremely Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans**

YANG Qiao^{1,2)}, ZHANG Xiao-Ling³⁾, ZHANG Lei²⁾, DAI Jun²⁾, ZHANG Jun-Xiang²⁾, JIAO Bing-Hua^{1)**}

⁽¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

⁽²⁾State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

⁽³⁾East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract To investigate the biosynthetic genes and the biological functions of carotenoids on the radioresistant mechanisms of the extremely radioresistant bacterium, *Deinococcus radiodurans*, the carotenoids of this bacterium were extracted with cold methanol and acetone, then were isolated and analyzed by LC-MS technique. Two colorless mutants knocking out of the phytoene synthase (*crtB*) and phytoene desaturase (*crtI*) genes were constructed by PCR and *in vivo* homologous recombination. The successful construction was confirmed by phenotype observation and carotenoids analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). Comparative analysis of the sensitivities among the two colorless mutants and wild R1 showed that the two colorless mutants were more sensitive to ionizing radiation (IR) and ultraviolet (UV), indicating that the deletion of *crtB* and *crtI* genes made the mutants unable to biosynthesize the crucial intermediate lycopene and series of downstream carotenoids. The scavenging abilities of the two carotenoids were measured using the ultraviolet induction of bacteriophage λ (UIB) system and electron spin resonance (ESR) spin trapping technique *in vivo* and *in vitro*, respectively. The results showed that the main two carotenoids exhibited significant antioxidant capacities to superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radicals ($\cdot OH$) which were two main types of free radicals produced during IR. This study has provided for the first time a new and direct evidence to explore the biosynthesis genes of carotenoids and their biological functions for the radioresistant mechanisms of *D. radiodurans*.

Key words *Deinococcus radiodurans*, carotenoids, radioresistance, free radicals

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00689

*This work was supported by the grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA091501, 2006AA09Z416, 2006AA09Z425) and China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (20080431365).

**Corresponding author. Tel: 86-21-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

Received: October 9, 2008 Accepted: November 25, 2008