

# UV 照射大肠杆菌对其吸收光谱的影响

杨天佑<sup>1,2</sup>, 李宗伟<sup>1</sup>, 张凤秋<sup>1</sup>, 陈林海<sup>1</sup>, 李宗义<sup>1</sup>, 秦广雍<sup>1\*</sup>, 霍裕平<sup>1</sup>

1. 郑州大学离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052

2. 河南科技学院生命科技学院, 河南 新乡 453003

**摘要** 探讨了样品池溶液及分光光度计内置紫外光对大肠杆菌吸收光谱测定的影响。发现样品池溶液(2.8 mL 双蒸水+0.1 mL 生理盐水+0.1 mL LB 培养基)较为合理, 既给细菌提供了有利的生存环境, 又对细胞的紫外吸收影响较小; 研究同时发现在 257 nm 波段 150 s 内细胞吸收强度基本没有变化, 说明内置的紫外光不会影响试验测定结果。在此基础上, 研究了 UV 照射 0, 20, 40, 60, 80, 120 s 大肠杆菌吸收光谱的变化情况。结果显示随着 UV 照射剂量的增加, 大肠杆菌吸收光谱存在一个先降后升再降的现象。该现象反映了辐射中细胞损伤死亡和修复存活的生物学效应。该研究从光谱学角度探讨了 UV 对大肠杆菌细胞的损伤作用, 对利用光谱技术研究细胞的辐射损伤、死亡和修复具有一定参考意义。

**关键词** UV 照射; 光谱; 大肠杆菌

**中图分类号:** O433.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)08-1600-03

## 引言

大肠杆菌细胞由细胞壁、细胞膜、细胞质和细胞核构成, 其主要成分为蛋白质、核酸、糖类和脂类。其中组成蛋白质的氨基酸中含有芳香族氨基酸, 如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸, 组成核酸的核苷酸中含有嘌呤和嘧啶, 这些成分都含有苯环共轭  $\pi$  键系统, 在紫外区都有光吸收能力, 从而使细胞在 200~300 nm 波长范围内也具有光吸收能力<sup>[1-3]</sup>。光谱技术是现代生物化学中研究生物大分子组成结构的重要手段, 是分析物质结构高灵敏度和高分辨率的快捷工具, 非常适于对生物大分子和细胞状态以及分子所处微环境的物理化学特性进行研究<sup>[4-6]</sup>。细胞的光谱检测可以获得细胞内生物大分子的分子结构和含量变化的信息。本文利用光谱技术探讨 UV 照射大肠杆菌引起细胞吸收光谱的变化, 从光谱学这一新角度探讨了 UV 照射引起大肠杆菌细胞损伤死亡以及修复存活的生物学效应。

## 1 实验材料

### 1.1 供试菌株及培养基

野生型 *E. coli* K12 菌株, 密西西比大学生命科学系 Justin courcelle 提供。该菌用 LB 培养基培养, pH 7.2, 培养温度 37 °C。

### 1.2 试剂

PBS 缓冲液, 生理盐水(0.9% NaCl 溶液), 双蒸水。

### 1.3 仪器

TU-1901 分光光度计(北京普析), 低温超速离心(美国 Beckman Coulter), 无菌操作台(安泰公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 UV 照射

打开紫外灯预热 20 min, 待灯的功率稳定后进行照射。紫外灯的功率为 20 W, 照射距离为 20 cm, 照射时间分别为 0, 20, 40, 60, 80, 120 s。样品照射后室温静置 5 h(防止细菌光复活, 以上操作都在红光下进行), 然后在 4 °C 及 4 000 rpm 下离心 5 min 沉淀细胞, 用双蒸水漂洗后再离心沉淀, 将细胞加入相应的样品池溶液中进行光谱吸收测定。

### 2.2 分光光度计测吸收光谱

分光光度计参数设定: 中速扫描, 扫描范围 200~350 nm, 采样间隔 1 nm, 光谱带宽 0.1 nm。

## 3 结果与分析

### 3.1 吸收光谱测定样品池溶液的选择

为了使测定结果有较高的灵敏度和准确度, 选择最佳的测定条件非常重要。由于所测样品为生物细胞, 还要考虑避

收稿日期: 2006-05-26, 修订日期: 2006-08-28

基金项目: 国家“973”课题项目(2004CB719604)资助

作者简介: 杨天佑, 1978 年生, 郑州大学离子束生物工程重点实验室博士 e-mail: yangtianyout2004@163.com \* 通讯联系人

免细胞饥饿死亡给试验带来的干扰。这就要求样品池中的溶液要科学合理,既要满足细胞基本营养的条件又可以得出所测样品详细而又准确的信息。图 1 为细胞在几个不同溶液中的测定结果,图中所示为细胞在不同溶液中的吸收光谱,其参比为与之相对应的溶液。

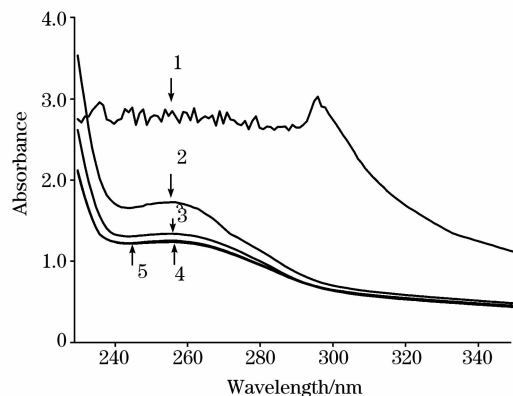


Fig. 1 *E. coli* cell's absorption spectra in different solutions

1: In 3 mL LB culture medium; 2: In 2.8 mL distilled water and 0.1 mL LB culture medium and 0.1 mL PBS; 3: In 2.8 mL distilled water and 0.1 mL LB culture medium and 0.1 mL 0.9% NaCl; 4: In 2.9 mL 0.9% NaCl and 0.1 mL LB culture medium; 5: In 2.9 mL PBS and 0.1 mL LB culture medium and 0.1 mL 0.9% NaCl

由图 1 可以看出, LB 培养基虽然可以为细胞提供丰富的营养,但是由于 LB 培养基中的成分在紫外范围有很强的吸收,从而淹没了细胞的吸收信号,很难获得细胞的吸收信息;同样细胞在 2.9 mL 生理盐水+0.1 mL LB 以及 2.9 mL PBS 缓冲液+0.1 mL LB 中的吸收较弱,可能是溶液中盐的浓度太高影响了细胞吸收光谱的测定;溶液 2.8 mL 双蒸水+0.1 mL 生理盐水+0.1 mL PBS 培养基和 2.8 mL 双蒸水+0.1 mL 生理盐水+0.1 mL LB 培养基中细胞的紫外吸收光谱较好,其中前者更为科学合理,该溶液既对细胞的紫外吸收强度影响很小,使得细胞的紫外吸收强度较强,又为细胞提供了有利的生存环境(营养物质和稳定的 pH 环境)。

### 3.2 UV 照射大肠杆菌对其紫外吸收光谱的影响

在细胞紫外吸收测定过程中,为减少紫外-分光光度计内置的紫外光影响细胞紫外吸收的测定结果,采用了较小的光谱带宽 0.1 nm。同时研究了 257 nm 细胞吸收随测定时间的变化以探讨仪器内置的紫外光对样品的影响(见图 2),可以看出在持续 150 s 测定细胞过程中,细胞在最大吸收波长 257 nm 处的吸收值基本没有变化,紫外-分光光度计内置紫外光对样品的影响可以忽略。

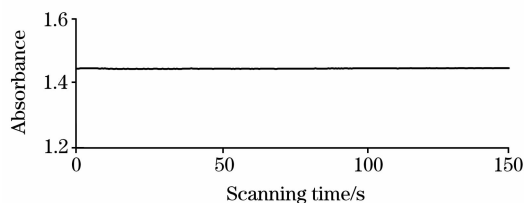


Fig. 2 Change of *E. coli* cell's 257 nm absorption in 150 s

UV 照射大肠杆菌中细胞的紫外吸收光谱变化见图 3。

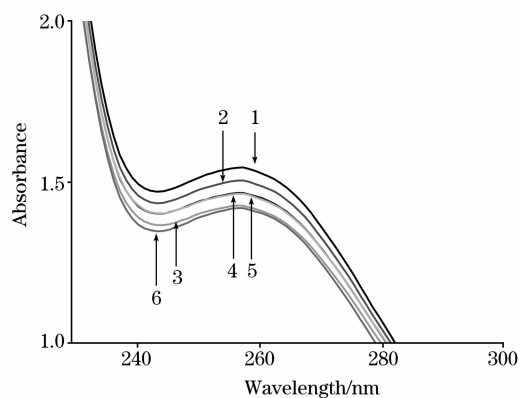


Fig. 3 Effect of UV on the absorption spectra of *E. coli* cells, radiated by UV for

1: 0 s; 2: 20 s; 3: 40 s; 4: 60 s; 5: 80 s; 6: 120 s

由图 3 可见,大肠杆菌最大吸收在 257 nm 左右。这是因为细胞内蛋白质中的芳香族氨基酸,如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸,在近紫外区(200~400 nm)有较强的光吸收,色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸的最大光吸收波长为 275, 258 和 280 nm<sup>[1]</sup>。核酸的基本结构单位核苷酸,核糖和磷酸在紫外区没有吸收,但嘌呤和嘧啶衍生物具有共轭双键系统,在 240~290 nm 范围内有强烈吸收<sup>[1]</sup>,蛋白质和核酸是构成细胞内原生的主要成分,所以大肠杆菌细胞吸收波长 257 nm 是两者综合吸收的结果。单位体积中细胞的数目,以及细胞内蛋白质与核酸含量都将影响大肠杆菌细胞的紫外吸收。如图 3 所示,UV 照射大肠杆菌可以引起其紫外吸收光谱发生改变;更为重要的是其紫外吸收光谱随时间增加并非是一直单调下降,而是存在先降后升再降的变化。作者认为形成这种现象的原因为。

(1)较小剂量照射时,UV 照射导致了细胞内维持生命的细胞内核蛋白质分子结构发生变化,产生蛋白质变性,结果会带来微生物新陈代谢的障碍,不能增殖并产生细胞破坏作用,特别是使得细胞内的 DNA 形成胸腺嘧啶双聚体,从而干扰 DNA 的复制,影响酶的活性,最后导致细菌的死亡<sup>[7]</sup>。随着剂量的增加,UV 对细胞内蛋白质与核酸损伤越大,细胞的存活越低,单位体积内细胞的数量越少,导致了细胞的吸收强度越来越弱。

(2)随 UV 照射剂量的增大,细胞内启动了某种修复功能, DNA 转录以及蛋白质表达增强,细胞内代谢较为活跃,细胞内蛋白和核酸含量升高,大肠杆菌抗辐射性能增加存活率升高<sup>[8-12]</sup>,导致了细胞的紫外吸收增强。

(3)当较高剂量照射时,细胞内的修复机制已远远不能修复 UV 对细胞的损伤,所以细胞死亡率又升高,大肠杆菌紫外区的光吸收又降低。

可见,辐射中大肠杆菌细胞损伤死亡和修复存活的生物学效应可以通过细胞紫外吸收光谱的变化得到反映,光谱技术为辐射中细胞损伤死亡以及修复存活的研究提供了又一新的手段。

## 4 结束语

光谱学方法的应用是现代生物化学中最重要和最有前景

的进展之一, 辐射生物学中利用光谱技术结合已有的分子生物学技术可以从一个新的视角在细胞水平、蛋白质水平、核酸水平研究辐射造成的细胞损伤以及细胞内生物大分子的动态过程。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] WANG Jing-yan, ZHU Sheng-geng, XU Chang-fa(王镜岩, 朱圣庚, 徐长法). Biochemistry 3rd ed(生物化学, 第 3 版). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 2002, 145. 507.
- [ 2 ] GUO Yao-jun(郭尧君). Technique of Spectral Photometer and Its Application in Biochemistry(分光光度技术及其在生物化学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1987. 223.
- [ 3 ] GE Xiang-hong, ZHAO Yuan-li, ZHANG Feng-qiu, et al(葛向红, 赵元黎, 张凤秋, 等). Acta Laser Biology Sinica(激光生物学报), 2004, 3(5): 383.
- [ 4 ] Eyten Osnat, Seia Ben-ami, Abraham Katzir. Applied Optics, 2000, 39(19):3357.
- [ 5 ] WANG Le-xin, ZHAO Zhi-min, YAO Hong-bing, et al(王乐新, 赵志敏, 姚红兵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 980.
- [ 6 ] XIE Ji-yun, JIANG Zhi-liang, ZHONG Fu-xin, et al(谢济运, 蒋治良, 钟福新, 等). Analysis and Testing Technology and Instruments (分析测试技术与仪器), 2000, 6(3): 178.
- [ 7 ] Kiyoshi Yoshino(Janpan), JIANG Wei(Translator)(山田健一(日), 姜 伟, 译). China Light & Lighting(中国照明电器), 2005, (8): 24.
- [ 8 ] XU Zhou-min, YU Li, LOU Fang-ding, et al(徐周敏, 于 力, 楼方定, 等). Chin J. Radiol Med Prot(中华放射医学与防护杂志), 2005, 25(4): 398.
- [ 9 ] SONG Dao-jun, WANG Ji, YAO Jian-ming, et al(宋道军, 王 纪, 姚建明, 等). Acta Laser Biology Sinica(激光生物学报), 1999, 8(1): 19.
- [ 10 ] GUO Ji-kui, WU Xiao-rong, JIANG Yan, et al(高继魁, 吴晓蓉, 蒋 彦, 等). Journal of Siciuan univarsity(四川大学学报), 1998, 35(3): 477.
- [ 11 ] HUANG Zhan-jing(黄占景). Hereditas(遗传), 1995, 17: 81.
- [ 12 ] Vonach R. Buschmarn J. Applied Spectroscopy, 1998, 52(6):820.

## Effect of UV on the Absorption Spectra of *E. coli* Cells

YANG Tian-you<sup>1,2</sup>, LI Zong-wei<sup>1</sup>, ZHANG Feng-qiu<sup>1</sup>, CHEN Lin-hai<sup>1</sup>, LI Zong-yi<sup>1</sup>, QIN Guang-yong<sup>1\*</sup>, HUO Yu-ping<sup>1</sup>

1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Life Science and Technology College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

**Abstract** The present article studied the effects of different solutions in sample cavity on the spectra of *E. coli*. It is shown that the solutions of 2.8 mL distilled water and 0.1 mL LB and 0.1 mL PBS is the best, because it not only supplies good living condition but also has less effect on the spectra of *E. coli*. And it was found that UV in spectrophotometer has no effect on the measurement result. On the basis of these studies the absorption spectra of *E. coli* irradiated by different doses UV were investigated. It is shown that there is a declining-rising-declining phenomenon in the spectra of *E. coli* with the dose increasing. This reflects the wound healing process of *E. coli*. Spectroscopic technique is helpful for the study of cell's wound healing.

**Keywords** UV irradiation; Absorption spectrum; *E. coli*

(Received May 26, 2006; accepted Aug. 28, 2006)

\* Corresponding author