

## 耐辐射球菌 *recQ* 双突变株的构建及逆境分析

黄丽芬<sup>1,2</sup>, 张韶文<sup>3</sup>, 华孝挺<sup>1</sup>, 高冠军<sup>1</sup>, 华跃进<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学 原子核农业科学研究所 农业部核农学重点开放实验室 杭州 310029)

(<sup>2</sup> 扬州大学 江苏省作物遗传生理重点实验室 扬州 225009)

(<sup>3</sup> 浙江大学医学院 杭州 310027)

**摘 要** RecQ 解螺旋酶是生物有机体在进化中高度保守的 SF1 超级家族解螺旋酶的一个亚族,它对维持基因组的稳定性有重要的作用。耐辐射球菌野生型菌株 R1 有两个具有特殊结构的解螺旋酶 DR1289 和 DR2444,运用 PCR 突变法克隆具有自身 *groEL* 启动子、*KAT* 启动子与卡那霉素抗性基因、氯霉素抗性基因融合的 DNA 片段反向重组到基因组中,首次构建并鉴定了卡那霉素抗性完全突变株  $\Delta$ DR1289,氯霉素抗性完全突变株  $\Delta$ DR2444,双突变株  $\Delta$ *recQ*。辐射条件下和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下突变株生存率结果表明: $\Delta$ DR2444 与 R1 存活率趋势线基本一致,而  $\Delta$ DR1289 和  $\Delta$ *recQ* 双突变株较为敏感。根据上述结果推测,DR1289 是一个对 R1 保持极端抗性的必须基因,而 DR2444 则是极端抗性的非必须基因。

**关键词** 耐辐射球菌;RecQ;突变

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)02-0205-05

自耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)发现以来,因其对电离辐射、紫外线、强氧化剂和化学诱变剂等具有超强的耐受力 and 修复能力而倍受人们的关注。研究表明,耐辐射球菌在极端环境下的生存是保护、耐受和修复三方面协同作用的结果<sup>[1]</sup>,是高效精确的 DNA 修复系统完成了 DNA 的损伤修复,但这种机制尚不清楚。据初步预测,*D. radiodurans* 中 DNA 修复途径包括碱基切除修复、直接损伤修复、核苷酸切除修复、碱基错配修复和重组修复等方式<sup>[2]</sup>。*D. radiodurans* 具有大多数细菌所具有的 DNA 重组酶如 Rec、Sbc 和 Ruv 系列酶,但缺少其它细菌如大肠杆菌所具有的 RecBCD、RecT 和 SbcB 等与重组有关的酶,阐明这些重组酶的功能对进一步探索该菌的 DNA 修复机制具有重要的理论意义和应用价值。

RecQ 解螺旋酶是一个重要的重组酶,从细菌到人类,RecQ 解螺旋酶家族对于维持基因组的稳定性都已显示了重要作用<sup>[3]</sup>。近几年来,因为人类基因组中 RecQ 的缺乏导致基因组不稳定、早衰和高癌变率的基因病,使得 RecQ 成为 DNA 重组修复研究的热点<sup>[4]</sup>。RecQ 是 SF1 超级家族解螺旋酶在进化中高度保守的一个亚族,1976 年,RecQ 解螺旋酶在

大肠杆菌中被首次发现并以此而命名<sup>[5]</sup>。耐辐射球菌中有两个具有特殊结构域的 RecQ 解螺旋酶:DR1289 和 DR2444,关于 RecQ 在 *D. radiodurans* 中的具体修复机制还未见报道。

研究基因功能的重要方法之一是构建基因的突变体来检测其表型的变化,以推测某个基因的生物学功能。一般最直接的方法是将目的基因敲除,这样可以保证被研究的基因完全失活。目前在 *D. radiodurans* 中构建突变体主要有两种方法:一种是插入突变<sup>[6,7]</sup>,即在待研究的基因内部找一个唯一的酶切位点,在这个位点处反向插入抗性基因,使基因失活;另一种方法是完全突变<sup>[8]</sup>,利用 PCR 反应 3 段连接法,将抗性基因与待研究基因的上下游片段连接起来,在靶基因两端建立较长的同源臂,通过结合转移,依靠同源重组系统将抗药性基因整合到细菌的染色体上。通过相应抗生素板的选择,可以筛选到基因敲除的缺失突变体的重组子。本研究依据 PCR 反应 3 段连接法构建了 *recQ* 的两个单突变株和一个双突变株,通过辐射条件下和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下突变株的生存率实验初步推测了 DR1289 和 DR2444 的功能。

基金项目:国家 973 项目(2004CB19604),国家自然科学基金重点资助项目(30330020),国家杰出青年基金项目(30425038)

\* 通讯作者。Tel: 86-571-86971703; E-mail: yjhua@zju.edu.cn

作者简介:黄丽芬(1975-),女,江苏靖江人,讲师,在职博士研究生,主要从事 DNA 损伤修复和分子调控研究。E-mail: h\_lf@sina.com.cn

收稿日期:2005-07-29;接受日期:2005-09-14;修回日期:2005-11-18

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *D. radiodurans* 野生型菌株 R1 (ATCC 13939) 购于美国 ATCC (American Type Culture Collection)。pKatCat 质粒为日本原子力研究所 Narumi 先生馈赠, pRADK 质粒为本实验室构建<sup>[9]</sup>。

**1.1.2 试剂:** 各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 纯化试剂盒、dNTP 购自 TaKaRa 公司。T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。其他试剂均为分析纯。

### 1.2 突变株的构建和转化

*D. radiodurans* 基因组 DNA 按常规方法进行提取。根据 NCBI 公布的 *D. radiodurans* 基因组序列, 用 Genetyx 软件分析 DR1289 基因 (NCBI-GeneID: 1799726) 和 DR2444 基因 (NCBI-GeneID: 1800402) 及前后 2000bp 基因序列, 确定未找到 BamHI 和 HindIII 酶切位点。用这两个特定的酶切位点设计突变靶基因的引物, DR1289 上游引物为: AF1 (5'-GCCGTTGTCTTCCAGTCCAGTGC-3') 和 AR1 (5'-TTATGAAGCTTGGGCCCGCCGGCCA-3'), DR1289 下游引物为: AF3 (5'-TATTTGGATCCCTCCCCA GGATAGC-3') 和 AR3 (5'-GGATGATGACGGTAGCG ACCTTAGC-3'); DR2444 上游引物为: BF1 (5'-GCCAAATCCGGCTCTCGGGCTTCAT-3') 和 BR1 (5'-TATTGAGGATCCGGCGCCTATTGTG-3'); DR2444 下游引物为: BF3 (5'-ACCGCTAAGCTTGCACACTATTCCGTA-3') 和 BR3 (5'-TTGCCGGGGCATGATCCCCAAAGT-3')。RecQ 双突变株引物设计见图 1, 即分别用卡那抗性基因正向插入到 *D. radiodurans* 中替代 DR1289 基因, 用氯霉素基因反向插入到 *D. radiodurans* 基因组中替代 DR2444 基因。通过靶基因前后片段与抗性基因利用相同的酶切位点进行 3 段连接, 以连接产物作模板, AF1/AR3 和 BF1/BR3 为引物分别扩增出两端含有较长的同源重组臂, 中间含有抗性基因的 PCR 片段。

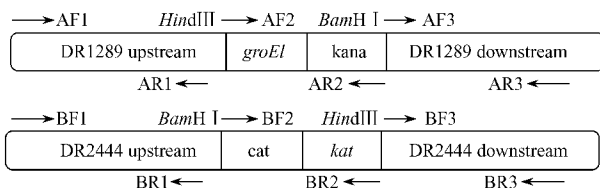


图 1 RecQ 双突变株构建示意图

Fig. 1 Scheme of cassette constructs for *D. radiodurans* recQ double mutation.

转化采用文献 [10] 所述方法, 即培养 R1 单菌落

至指数生长期, 30mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 TGY 溶液将 R1 培养 1.5h 后使其处于感受态, 加入含抗性基因的 PCR 产物, 30℃ 培养 36h, 20μg/mL 卡那霉素 TGY 平板上筛选 DR1289 突变子, 命名为 ΔDR1289。3μg/mL 的氯霉素 TGY 平板筛选 DR2444 突变子, 命名为 ΔDR2444。在双抗平板上筛选双突变株, 命名为 ΔrecQ。

### 1.3 突变株的鉴定

TGY 抗性板上长出相应的突变子后, 挑取单菌落培养至饱和状态, 提取基因组作模板, 以 AF1/AR3 和 BF1/BR3 两对引物分别进行 PCR 扩增, PCR 产物经胶回收后, 用 BamHI 和 HindIII 酶切, 如能酶切出相应的启动子和抗性基因的融合片段即初步确认为突变株。将 PCR 产物测序, 进一步鉴定是否为相应的突变株。

### 1.4 辐射条件下突变株的生存率测定

辐照试验在浙江大学辐照中心进行。菌株的辐射抗性检测按以下步骤进行: 挑 R1 或突变菌株单菌落, 30℃ 培养至对数生长晚期, 稀释 100000 倍后悬浮于 20mmol/L 磷酸缓冲液中, 在室温下, 用<sup>60</sup>Co-γ 射线急性处理, 辐照剂量大小根据样品距离钴源的位置来确定。辐照后取 100μL 迅速涂布于 TGY 平板上, 30℃ 培养 36h 后计数。计数软件用 BIO-RAD Image 系统, 以未辐照处理的作为对照计算存活率, 每个处理取 4 次试验的平均值。

### 1.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化压力下突变株的生存率测定

菌株培养至对数生长晚期, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别至终浓度 5、10、20、30、40mmol/L, 1h 后取菌液, 以未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的分别作对照, 平板计数计算存活率。

## 2 结果和分析

### 2.1 *D. radiodurans* RecQ 的结构域及其特征

所有的 RecQ 解螺旋酶都是沿着 3'→5' 方向解开与该酶所结合的 DNA 链<sup>[11]</sup>。RecQ 解螺旋酶家族包含一个由 7 个高度保守的氨基酸基元 (I, Ia, II-VI) 组成称为解螺旋酶 (helicase) 的中心结构域。在中心结构域的 C 端是 RQC 结构域 (RecQ family C-terminal), 该结构域也是 RecQ 解螺旋酶的特征之一, 它似乎能介导蛋白质之间的互作<sup>[12]</sup>。第三个保守结构域是 HRDC (helicase RNase D C-terminal), 这个结构域是解螺旋酶和核酸酶 D 家族的一个同源结构域, 因为 HRDC 结构域在这两个酶家族中都参与了核酸代谢。有假说认为它参加了与核酸的结合。

而与核酸的结合是在 *RecQ* 和 *RNase D* 中所唯一共有的功能<sup>[13]</sup>。*D. radiodurans* 两个 *RecQ* 的结构域都与其他物种有很大差别。DR2444 带有一个与胱硫醚  $\gamma$ -裂解酶同源的结构域和 HRDC 结构域, 却不含有解螺旋酶的中心结构域。DR1289 具有解螺旋酶中心结构域, 还包含 3 个串联的 HRDC 拷贝。目前除了 *Deinococcus* 和奈瑟球菌属(*Neisseria*) 有 3 个串联的 HRDC 拷贝外, 在其它所有细菌中只有单个 HRDC 拷贝。尽管还未见过关于耐辐射奇球菌 *RecQ* 的详细报道, Makarova<sup>[21]</sup> 推测耐辐射奇球菌之所以具有非常强大的耐辐射能力, HRDC 结构域的增殖可能将贡献于修复重组过程中 *RecQ* 与 *RecA* 的互作, 它们在耐辐射球菌的重组修复中必定有其特定的功能。

## 2.2 *RecQ* 双突变株的构建

为了抗性基因能够在 *D. radiodurans* 中正常表达, 必须将 *D. radiodurans* 识别特定的启动子(如本文中的 *groEL* 和 *Kat*) 与相应的抗性基因融合表达。穿梭质粒 pRADK 将 *groEL* 启动子与卡那霉素抗性基因融合表达, 而 p*Kat*Cat 质粒将 *Kat* 启动子与氯霉素抗性基因融合。以 R1 为模板, AF1/AR1 为引物 PCR 扩增出 DR1289 上游片段 696bp, PCR 产物回收后用 *Hind*III 完全酶切, 回收纯化出片段 A1; 以 R1 为模板, AF3/AR3 为引物 PCR 扩增出 DR1289 基因下游片段 887bp, PCR 产物回收后用 *Bam*H I 完全酶切, 回收纯化出片段 A3; 质粒 pRADK 经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后, 回收纯化出 *groEL* 启动子与卡那霉素抗性基因融合表达片段 A2。图 2 第 13 道即是经 3 段连接后的产物, 第 2~6 道是以 3 段连接产物为模板, AF1/AR3 为引物扩增出中间含有抗性基因, 两端含有较长同源臂的片段, 大小为 2671bp。第 7~11 道是以 R1 为模板, AF1/AR3 为引物 PCR 扩增出含有 DR1289 基因的对照片段, 大小为 4058bp。

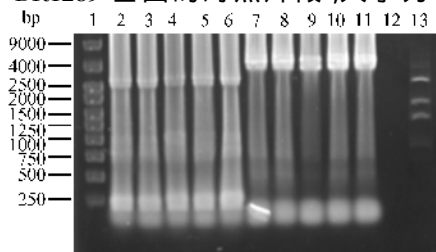


图 2 突变 DR1289 三段连接产物示意图

Fig.2 Three DNA fragments were ligated as the cassette for DR1289 deletion. 1. DNA size marker; 2~6. PCR products of primers AF1 and AR3 from ligation product; 7~11. PCR products of primers AF1 and AR3 from *D. radiodurans* R1; 13. Ligation product of three DNA fragments.

DR2444 基因突变株的构建同 DR1289, 只是抗药基因改成由 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切回收的 *Kat* 启动子与氯霉素抗性基因融合片段。

利用 1.2 所述方法将 PCR 产物转化到 R1 中, 筛选突变子。将 DR2444 氯霉素 3 段连接产物 PCR 后转化到 DR1289 突变株( $\Delta$ DR1289)中, 用 20  $\mu$ g/mL 的卡那霉素、3  $\mu$ g/mL 的氯霉素双抗性 TGY 平板筛选双突变株。

## 2.3 *RecQ* 双突变株的鉴定

图 3 为 DR1289 突变株的鉴定图谱。第 2, 4, 6, 8, 10 的 DNA 都是来自于 R1, 3, 5, 7, 9, 11 都来自于突变株。其中第 2 道以 AF2/AF2 为引物, R1 为模板 PCR 出 DR1289 片段 2475bp; 而第 3 道以同样的引物, 突变株基因组为模板却扩增不出任何片段。第 4 泳道是以 R1 基因组为模板, AF1/AR3 为引物 PCR 出 4058bp 片段, 命名为 R1AW, 第 6, 8, 10 泳道为 R1AW 经过 *Bam*H I 单酶切, *Hind*III 单酶, *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切之后的产物, 图中可看出该片段不能够被 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切, 第 5 道是以突变株为模板, AF1/AR3 为引物 PCR 出 2671bp 的片段, 命名为 MAW, 第 7 道是 MAW 经 *Bam*H I 单酶切后得到的 887bp 和 1784bp 片段, 第 9 道是 MAW 经 *Hind*III 单酶后得到的 696bp 和 1975bp 片段, 11 道是 MAW 经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后得到的 696bp, 887bp 和 1088bp 片段, 与预期的上下游片段和 *GroEL*-kana 片段大小相一致。MAW 经测序后进一步证明了 DR1289 突变成功。

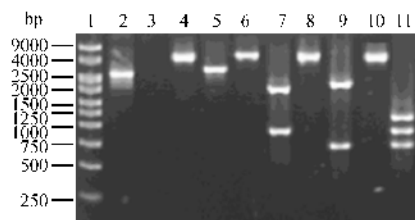


图 3 DR1289 突变株鉴定

Fig.3 Verification of DR1289 deficient strain. 1. DNA size marker; 2, 4, 6, 8 and 10. DNA from *D. radiodurans* R1; 3, 5, 7, 9 and 11. DNA from DR1289 deletion strain. 2 and 3. PCR products of primers AF2 and AR2; 4 and 5. PCR products of primers AF1 and AR3; 6 and 7. *Bam*H I digestion of DNA in lanes 4 and 5, respectively; 8 and 9. *Hind*III digestion of DNA in lanes 4 and 5, respectively; 10 and 11. *Bam*H I and *Hind*III digestion of DNA in lanes 4 and 5.

图 4 为 DR1289 和 DR2444 双突变株的鉴定图谱。提取该突变株的基因组后, 以 AF1/AR3 和 BF1/BR3 为引物分别扩增出 M2WA 和 M2WB, 图 4 中第 2 道为 M2WA 经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后得到的 3

个片段,第3道是 M2WB 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后得到的 3 个片段,分别为 1300bp,902bp 和 819bp,与目的片段大小一致。M2WA 和 M2WB 经测序后证明该双突变株的构建已成功。

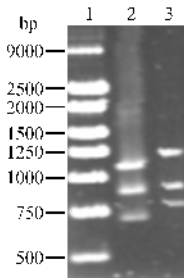


图 4 *RecQ* 双突变株鉴定

Fig.4 Verification of double *recQ* deficient strain. 1. DNA size marker; 2. *Bam*H I and *Hind* III digestion of DNA in PCR products of primers AFI and AR3; 3. *Bam*H I and *Hind* III digestion of DNA in PCR products of primers BF1 and BR3.

## 2.4 辐射条件下突变株存活率的测定

菌株在不同辐照剂量下的细胞存活率见图 5-A, R1 具有极强的辐射抗性,8000Gy 辐照剂量下还有 57% 的存活率,而基因功能缺陷株  $\Delta$ DR2444 对辐射并不敏感,呈现出与 R1 相似的辐射存活率曲线。 $\Delta$ DR1289 单突变株和  $\Delta$ *recQ* 双突变株呈现出相象的辐射存活率曲线,基因功能缺陷株  $\Delta$ DR1289 和  $\Delta$ *recQ* 双突变株对辐射较为敏感,在 250Gy 剂量下仅有约 50% 的存活率,在 1000Gy 剂量下有约 30% 的存活率,而 R1 在这两个剂量下存活率都在 95% 以上。在高剂量下, $\Delta$ DR1289 和  $\Delta$ *recQ* 双突变株对辐射较 R1 更敏感,在 8000Gy 剂量下 R1 和  $\Delta$ DR2444 的存活率为 57%,而双突变株只有约 10%。从该曲线初步推测, $\Delta$ DR2444 是一个对 R1 保留辐射极端抗性的非必须基因,它可能参与细胞的其他代谢途径。而 DR1289 是辐射极端抗性的必须基因,在 DNA 损伤修复中,它可能起着较为重要的作用。

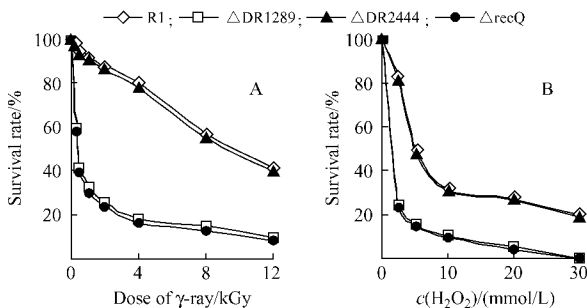


图 5 *RecQ* 突变株的辐射存活率(A)和  $H_2O_2$  生存率(B)

Fig.5 Survival curves of *recQ* mutants(A) gamma-rays and (B)  $H_2O_2$ .

## 2.5 突变株的 $H_2O_2$ 生存率

基因功能缺陷株  $\Delta$ DR1289 和  $\Delta$ *recQ* 双突变株

是对过氧化氢非常敏感的菌株(图 5-B),且与辐射抗性相类似的是,这两个突变株  $H_2O_2$  生存率曲线非常相象,在 2.5mmol/L 的低剂量下存活率仅有 20%,而 R1 为 85%。 $\Delta$ DR2444 突变株对  $H_2O_2$  并不敏感,存活率趋势线仍与 R1 基本一致。从该实验结果推测, $\Delta$ DR2444 对  $H_2O_2$  氧化损伤修复并无贡献,而 DR1289 是对  $H_2O_2$  氧化损伤修复过程中一个非常重要的基因。

## 3 讨论

已有研究表明<sup>[14,15]</sup>,在 DNA 受到损伤之后,*RecQ* 解螺旋酶与多种蛋白一起执行了两个主要功能:一是起始重组,帮助修复 DNA 损伤;二是抑制非法重组,维持基因组的稳定性。*RecQ* 解螺旋酶在不同代谢阶段对于维持基因组的稳定性具有重要的作用。Hanada 等<sup>[16]</sup>研究结果表明:*E. coli recQ* 突变株对紫外线敏感,它与人类 *recQ* 染色体异常具有相似的生物学效应,*recQ* 的突变株能够使瞬间非法同源重组提高 20~300 倍,而紫外线诱导非法重组将提高约 10~100 倍。*D. radiodurans* 中 DR2444 是第一个不含有解螺旋酶中心结构域的 *recQ* 基因,本研究的逆境实验分析表明,敲除该基因并不影响细菌的抗逆性,它可能只是一个通过移码而获得的基因。而 DR1289 则在结构上更具有 *RecQ* 的典型特征,它的 Helicase 中心结构域与大肠杆菌的中心结构域具有高达 69% 的同源性,DR1289 的 3 个 HRDC 结构域与大肠杆菌相比也有较高的同源性,DR1289 完全突变株的表型特征与大肠杆菌 *recQ* 突变株相似,因此我们推测该基因的这两个结构域在功能上也具有一定程度的相似性,但这 3 个串联的 HRDC 结构域具体行使什么重要的功能还有待于进一步研究。*RecQ* 作为耐辐射球菌 DNA 修复机制中一个特殊结构的基因,研究该蛋白的结构域与功能的关系(另文发表),探讨该蛋白与多个蛋白的互作对于揭示 *D. radiodurans* 高效精确的 DNA 修复机制具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [1] Minton KW. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol*, 1994, 13: 9-15.
- [2] Makarova KS, Aravind L, Yuri I, et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65: 44-79.

- [ 3 ] Jennifer A , Cobb LB , Susan M , *et al.* RecQ helicases : at the heart of genetic stability. *FEBS Letters* , 2002 , **529** : 43 – 48.
- [ 4 ] Mohaghegh P , Hickson ID. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet* , 2001 , **10** : 741 – 746.
- [ 5 ] Bachrati CZ , Hickson LD. RecQ helicases : suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* , 2003 , **374** : 577 – 606.
- [ 6 ] Kitayama S , Narumi I , Kikuchi M , *et al.* Mutation in *recR* gene of *Deinococcus radiodurans* and possible involvement of its product in the repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research* , 2000 , **461** : 179 – 187.
- [ 7 ] Hua YJ , Narumi I , Gao GJ , *et al.* PprI : a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* . *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2003 , **306** : 354 – 360.
- [ 8 ] Ruan BF , Nakano H , Tanaka M , *et al.* CysteinyI-tRNA<sup>Cys</sup> Formation in *Methanocaldococcus jannaschii* : the mechanism is still unknown. *Journal of Bacteriology* , 2004 , **186** ( 1 ) : 8 – 14.
- [ 9 ] Gao GJ , Lu HM , Huang LF , *et al.* Construction of DNA damage response gene *pprI* function deficient and function complementary mutants in *Deinococcus radiodurans* . *Chinese Science Bulletin* , 2005 , **50** ( 4 ) : 311 – 316.
- [ 10 ] Earl AM , Rankin SK , Kim KP , *et al.* Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J Bacteriol* , 2002 , **184** : 1003 – 1009.
- [ 11 ] Khakhar RR , Cobb JA , Bjergbaek L , *et al.* RecQ helicases : multiple roles in genome maintenance. *Trends in Cell Biology* , 2003 , **13** ( 9 ) : 493 – 501.
- [ 12 ] Hanada K , Ukita T , Kohno Y , *et al.* A putative nucleic acid binding domain in Bloom and Werner syndrome helicases. *Trends Biochem Sci* , 1997 , **22** : 417 – 418.
- [ 13 ] Bjergbaek L , Cobb JA , Gasser SM , *et al.* RecQ helicases and genome stability : lessons from model organisms and human disease. *Swiss Med Wkly* , 2002 , **132** : 433 – 442.
- [ 14 ] Hanada K , Iwasak M , Ihashi S , *et al.* UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination : Synergistic action with RecQ helicase. *Prog Nucleic Acid Sci* , 2000 , **97** ( 11 ) : 5989 – 5994.
- [ 15 ] Harmon FG , Brockman JP , Stephen C , *et al.* RecQ Helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III . *The Journal of Biological Chemistry* , 2003 , **278** ( 43 ) : 42668 – 42678.
- [ 16 ] Khakhar RR , Cobb JA , Bjergbaek L , *et al.* RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli* . *Proc Natl Acad Sci* , 1997 , **94** : 3860 – 3865.

## Construction of the *recQ* double mutants and analysis of adversity in *Deinococcus radiodurans*

HUANG Li-fen<sup>1,2</sup> , ZHANG Shao-wen<sup>3</sup> , HUA Xiao-ting<sup>1</sup> , GAO Guan-jun<sup>1</sup> , HUA Yue-jin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>2</sup> Jiangsu Province Key Lab of Crop Genetics and Physiology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(<sup>3</sup> University Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract** : As a subfamily member of SF1 superfamily, the RecQ helicases are highly conserved in evolution and are required for maintaining genome stability in all organisms. Loss of RecQ helicase function leads to a breakdown in the maintenance of genome integrity, in particular hyper-recombination. Named after the *recQ* gene of *Escherichia coli*, lower eukaryotic species generally only contain a single RecQ family representative; for example, Sgs1 in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and Rqh1 in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. There are, however, multiple members in most higher organisms, with five being present in humans. Defects in three of these human RecQ helicases give rise to defined clinical disorders associated with cancer predisposition and variable aspects of premature aging. *Deinococcus radiodurans* encodes two *recQ* genes with unusual domain: DR1289 and DR2444, whose functions, however, remain obscure currently. DR1289 contains three tandem copies of the C-terminal helicase-RNase D (HRDC) domain, instead of the single copy present in all other bacteria except *Neisseria* that similarly possesses three copies. DR2444 contains a HRDC domain and a domain homologous to cystathionine gamma-lyase; this is the first example of an HRDC domain that is not associated with either a helicase or a nuclease. In this study, a fusion DNA fragment carrying kanamycin resistance gene with the *D. radiodurans* *groEL* promoter, chloramphenicol resistance gene with KAT promoter was cloned by PCR amplification and reversely inserted into the *recQ* locus in the genome of the wild-type strain R1. Three resulting *recQ*-deficient strains, designated  $\Delta$ DR1289,  $\Delta$ DR2444 and  $\Delta$ *recQ* (double mutation), were constructed. Results show that  $\Delta$ DR1289 and  $\Delta$ *recQ* were very sensitive to ionizing radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while  $\Delta$ DR2444 and wild strain R1 were not. The phenotype of  $\Delta$ DR1289 was similar to many RecQ helicase mutants. Therefore, it was presumed that DR1289 was the necessary gene in maintaining the extreme resistance to DNA damaging agents, whereas DR2444 was not. Further research based on genetic and biochemical approaches should help to gain a better understanding of the genes involved in DNA repair.

**Keywords** : *Deinococcus radiodurans*; *recQ*; Mutant

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB19604); National Natural Science Foundation of China (30330020); The Distinguished Young Scientists of China (30425038)

\* Corresponding author. Tel 86-571-86971703; E-mail : yjhua@zju.edu.cn

Received 29 July 2005/Accepted 14 September 2005/Revised 18 November 2005