

耐辐射奇球菌 *dps* 突变株的构建和蛋白功能初步研究

严卓彦, 许镇坚, 许光治, 田兵, 华跃进*

(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)

摘 要 *Dps* (DNA protection during starvation) 蛋白是原核生物中特有的一类具有铁离子结合和抗氧化损伤功能的重要蛋白。利用体外 PCR 扩增技术和体内同源重组方法, 获得了耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) *dps* 全基因 (DRB0092) 缺失突变株。对突变株和野生型分别进行不同浓度过氧化氢 (H_2O_2) 处理, 结果表明: 与野生型菌株 R1 相比, *dps* 突变株在低浓度 H_2O_2 ($\leq 10\text{mmol/L}$) 条件下存活率急剧下降, 而高浓度 ($\geq 30\text{mmol/L}$) 下则完全致死。Native-PAGE 活性染色结果显示, 稳定生长期 *dps* 突变株体内两种过氧化氢酶 (KatA 和 KatB) 的活性较野生型 R1 分别上调 2.3 倍和 2.6 倍。通过质粒构建和大肠杆菌诱导表达, 获得可溶性 *Dps* 蛋白。体外结合和 DNA 保护实验结果显示, *Dps* 具有明显的 DNA 结合功能, 并能保护质粒 DNA 免受羟自由基攻击。本研究证明, *Dps* 蛋白在耐辐射奇球菌抗氧化体系中发挥重要作用, 可能对该菌极端抗性机制有重要贡献。

关键词: 耐辐射奇球菌; *dps* 突变株; 抗氧化; *Dps* 蛋白; DNA 保护

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0610-06

耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*, 简称 DR) 是一种红色革兰氏阳性极端微生物, 最先由 Anderson 等^[1]在 1956 年从辐射灭菌后变质的肉类罐头中分离出来。DR 菌对电离辐射、紫外线、干燥和氧化损伤表现出极强的抗性^[2]。高效的 DNA 损伤修复机理和抗氧化保护机制是当前的研究热点^[3,4], 但已有的研究仍不能阐明 DR 菌所具有的这种超强极端抗性^[5]。Markillie 等^[6]发现过氧化氢酶基因 (*kata*) 和超氧化物歧化酶基因 (*soda*) 的突变会导致 DR 菌对电离辐射敏感性的增加。周绪斌等^[7]的研究报告也指出高活性的蛋白酶在细胞受损伤后的氧化性环境中对 DR 菌增强氧化抗性具有重要作用。最近, Daly 等的研究报告指出, 电离辐射产生的 DNA 损伤约 80% 是由辐射水解产生的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 攻击而间接导致的^[4]。此外, 我们的研究也证实 Deinoxanthin 等色素代谢产物的缺失会增加 DR 菌对电离辐射和过氧化氢 (H_2O_2) 的敏感性^[8]。上述研究表明, 氧化抗性防御机制在 DR 菌中对其极端抗性具有重要的贡献, 但至今该菌抗氧化体系的具体机制和分子机理仍然不明^[5]。因此, 鉴定和研究该菌中其它抗氧化功能相关的蛋白, 对阐明抗氧化机制在 DR 菌中的贡献及解释其极端抗性机制具有重要的意义。

Dps (DNA protection during starvation) 蛋白是细菌中特有的一类具铁离子结合功能的蛋白, 在细胞内以 12 个亚基组成的球形多聚体结构存在, 与细菌铁蛋白 (bacterioferritin) 及真核生物中的铁蛋白 (ferritin) 具有类似的结构并组成铁蛋白超家族^[9]。*Dps* 蛋白最先由 Almiron 等在受饥饿和氧化胁迫的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中发现, 它能保护细胞应对包括过氧化氢、金属毒性、低 pH 和高温等多种逆境压力^[10]。已报道的 *Dps* 蛋白绝大多数拥有其它铁蛋白并不具备的非特异 DNA 结合功能, 晶体结构分析表明: DNA 结合功能与该蛋白 N 端存在赖氨酸保守残基位点相关^[11]。研究表明, *Dps* 蛋白有效保护 DNA 免受各种损伤, 主要通过两种机制: 1) *Dps* 能高效结合游离态亚铁离子, 维持细胞内铁的动态平衡, 从而防止过剩的 Fe^{2+} 和 H_2O_2 发生 Fenton 反应产生羟自由基攻击 DNA^[12]; 2) *Dps* 蛋白与 DNA 的直接结合作用, 将 DNA 包被形成致密的蛋白-DNA 复合体, 从而保护 DNA 免受外界的各种攻击^[13]。

DR 菌中有两个基因 (DRB0092 和 DR2263) 编码 *Dps* 蛋白同源物, 关于 DR2263 基因已有的研究表明: 不同盐离子浓度条件下, 该蛋白在体外能形成不同形式的多聚体并能结合不同构型的 DNA^[14]。但对于 *Dps* 蛋白对 DR 菌抗氧化体系的贡献及

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: 严卓彦 (1982-), 女, 浙江舟山人, 硕士研究生, 主要从事极端微生物研究。E-mail: yanzhuoyan@hotmail.com

收稿日期: 2006-12-21; 接受日期: 2007-03-07; 修回日期: 2007-03-18

DRB0092 基因功能与蛋白生化特性国内外未见报道。本试验通过体内同源重组的方法首次对 DR 菌中 *dps* 基因(DRB0092)进行突变,获得 *dps* 基因完全缺失突变株,并对其功能进行了研究,通过 *Dps* 蛋白在大肠杆菌中的重组表达和纯化,对其 DNA 结合能力和保护功能进行了体外鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :试验使用的菌株、质粒及其特性见表 1。

表 1 供试用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5a	<i>SupE44, Δlac</i> Ul 6, <i>hsd</i> R17, <i>rec</i> Al end Al, <i>gry</i> A966, <i>thi</i> -1, <i>rel</i> Al	Store in this lab
BL21(DE3)	B F ⁻ <i>dcn ompT hsdS r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal</i> λ(DE3)	Novagen
BL21-dps	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pET28a-dps	This study
<i>D. radiodurans</i>		
R1	Wild type strains(ATCC 13939)	Store in this lab
Kdps	<i>D. radiodurans</i> <i>dps</i> gene knockout mutant	This study
Plasmids		
pGEM-T easy	ColE, Amp ^r	Promega
pTC	T vector with <i>dps</i> gene flanking sequence and Cm cassette, Amp ^r	This study
pET28a	Expression vector, Kan ^r	Novagen
pET28a-dps	pET28a containing <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I fragment of <i>dps</i> , Kan ^r	This study
pKatCAT	resource of chloromycetin resistant cassette, Amp ^r and Cm ^r	I. Narumi Lab

Amp^r, Kan^r and Cm^r indicated resistance to ampicillin (50μg/mL), kanacillin (20μg/mL) and chloromycetin (3μg/mL) respectively.

1.1.2 培养基、试剂和仪器 :大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 LB 液体培养基或含 1.5% 琼脂的固体培养基,温度 37℃ ; *D. radiodurans* 用 TGY 培养基(每升水含 5g 胰蛋白胍, 3g 酵母提取物, 1g 葡萄糖)培养,温度 30℃。本试验所用各种工具酶和 pUC19 质粒购自 TaKaRa 公司。亚克隆载体 pGEM-T easy 购于 Promega 公司。蛋白纯化试剂盒 Ni-NTA Superflow 购自 QIAGEN 公司。引物合成和 DNA 测序反应均委托上海博亚公司完成。凝胶成像系统 Model-3000 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 突变株的构建

以 NCBI 数据库公布的 DR 菌基因组为模板,用 Primer Premier 5(PREMIER Biosoft International, USA)软件设计引物 :UPF :5'-TAGTTGTTGTTGGTCAGCCCGGTCAGTT-3', UPR :5'-GGGTGGGGATCCGTTTTTCTCCTTATCAT-3'(划线部分为 *Bam*H I 位点)扩增产物 PCR1 为 DRB0092 基因的上游序列 ;引物 DNF :5'-TAGTTTAAGCTTGCCGAGCATCACCGAG-3'(划线部分为 *Hind* III 位点), DNR :5'-TGTTTGTGTGGTTCAACGACTCCTACGG-3' 扩增产物 PCR2 为 DRB0092 基因的下游序列。PCR1 和 PCR2 分别经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后与用同样酶双酶切的含 *Kat* 启动子的

氯霉素抗性基因片段连接。以 3 段连接产物做模板,用 P1 和 P4 引物扩增得到包含目的基因上下游序列和氯霉素抗性基因的产物 PCR3。将 PCR3 连接到 T-Vector 获得 pTC 质粒。pTC 经 *Eco*RV 内切酶线性化后转化 R1 菌株,氯霉素抗性基因经体内同源重组进入 DR 菌基因组中,用 3mg/L 氯霉素筛选获得 *dps* 基因完全缺失突变株。

1.3 H₂O₂ 处理

将菌株分别培养至稳定生长期(*OD*₆₀₀ 约 1.5),取样品用 10mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.6)稀释至约 10⁷ cell/mL 后分装至 1.5mL Eppendorf 管。加入 1mol/L H₂O₂ 母液分别至不同的终浓度,混匀后置 4℃ 避光处理 30min。加过量过氧化氢酶(100μg/mL)终止反应,稀释样品至合适浓度后分别涂板,以未经 H₂O₂ 处理的菌液作对照。30℃ 培养 3d 统计菌落数并计算存活率。H₂O₂ 处理独立进行 3 次,以 3 次的平均值作为计数值。

1.4 过氧化氢酶活性检测

培养菌株至稳定生长期,加终浓度 20mmol/L H₂O₂ 处理 30min,分别离心收集菌体,20mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液清洗 2 次并冰上超声破碎,10000g 离心 30min 收集蛋白上清液。以相同生长期

未经 H_2O_2 处理的菌体蛋白作对照。蛋白浓度定量采用常规 Bradford 染色法^[15]。取 $80\mu g$ 蛋白进行非变性凝胶电泳(Native-PAGE),电泳结束后立即进行过氧化氢酶活性染色,染色方法详见参考文献[16],染色后用成像系统拍照成像,凝胶中电泳条带的荧光强度用 TotalLab 图像分析软件进行扫描定量分析。

1.5 *dps* 的体外克隆、重组蛋白的表达和纯化

Primer Premier 5 软件设计表达引物:B92F:5'-GGTTGGGGATCCGATGCGTCATTCTGTG-3'(划线部分为 *Bam*H I 位点),B92R:5'-TATTTATTCTCGAGCGGCCACGCAGCGG-3'(划线部分为 *Xho* I 位点)。PCR 扩增获得含 *dps* 基因全长的 PCR 产物,进行 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切,电泳纯化回收并将目的片段连接到 pET28a 质粒,最后将获得的表达质粒 pET28a-*dps* 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 获得表达菌株 BL21-*dps*。

挑取单菌落接种至 LB 培养基,37℃ 培养过夜。次日以 1% 接种量接种至 400mL 培养基,37℃ 培养至 OD_{600} 约 0.5,加 0.2mmol/L IPTG 进行诱导表达。30℃ 诱导 4h 后 10000g 离心 10min 收集菌体,20mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液清洗 2 次后进行超声破细胞,提取上清液进行 SDS-PAGE 分析。重组蛋白可有效结合于 Ni-NTA-Agarose,采用不同浓度的咪唑分步洗脱,大部分目的蛋白在 100mmol/L 的咪唑被洗脱,进一步的操作按照参考文献[17]进行。

1.6 *Dps* 蛋白与 DNA 的体外结合实验

Dps 蛋白与 DNA 进行体外反应前,先用戊二醛进行交联(crosslink)处理。根据 Anne Grove 和 Steven P. Wilkinson 的方法^[14]配制交联反应液:20mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),50mmol/L NaCl 和 0.1%(V/V)戊二醛,加入 $10\mu g$ 纯化的 *Dps* 蛋白后置室温孵育 30min。取一系列 Eppendorf 管($200\mu L$)作为对照和样品的反应管,依次加入质粒 pUC19(0.5g/L)0.5 μL 和不同体积交联后的 *Dps* 蛋白(空白对照用相同体积的 Tris-HCl 代替),用 Tris-HCl 缓冲液补足至 10 μL 反应体系,置 30℃ 孵育 30min。然后依次加入 $F_6(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (终浓度 200 $\mu mol/L$)和 H_2O_2 (终浓度 80mmol/L),室温反应 15min。最后加入终浓度为 1% 的 SDS 终止反应。将全部反应产物上样,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,恒压 80V,电泳 90min。电泳结束后立即取出凝胶,置 0.5mg/L 溴化乙锭(EB)溶液中染色 30min,转移到凝胶成像系统拍照

成像。

2 结果和分析

2.1 DRB0092 突变株的构建及鉴定

为获得 *dps* 基因缺陷突变株,我们从穿梭质粒 pKatCAT(日本原子力研究所 Narumi 教授赠)双酶切得到含耐辐射奇球菌 *kat* 启动子的氯霉素抗性基因,反向插入目标基因(DRB0092)的上下游序列之间。通过体内同源重组方法用抗性基因将目标基因完全替换,再经氯霉素抗性筛选获得 *dps* 基因缺失突变株 *Kdps*。通过 PCR 和酶切来鉴定融合 DNA 片段插入的正确性。以上述 P1 与 P4 引物进行 PCR 反应,以抗性标记基因内部含有的一个 *Nde* I 酶切位点进行单酶切验证。以 *Kdps* 基因组为模板扩增得到的全长片段为 2130bp,它的酶切片段长度分别为 685bp 和 1445bp,与预期的 DNA 片段大小一致,能清楚区分野生型菌株 R1 的 PCR 全长片段(1966bp)。克隆的片段通过 DNA 测序进一步验证了试验结果的正确性。

2.2 H_2O_2 氧化压力条件下的存活率

为了研究 *dps* 基因的功能及其对 DR 菌抗氧化作用的贡献,我们对 R1 野生型和 *Kdps* 突变株分别进行了不同浓度过氧化氢处理,考察它们在氧化压力胁迫条件下的存活率变化。图 1 表明,与 R1 野生型相比,*dps* 基因的缺失导致突变株对氧化损伤变得极为敏感,在稳定生长期,10mmol/L H_2O_2 条件下,*Kdps* 突变株在 30min 内生存率下降明显,只有不到 14% 的存活率,而野生型菌株仍有 70% 的存活率;当 H_2O_2 浓度升至 20mmol/L 时,突变株 *Kdps* 存活率

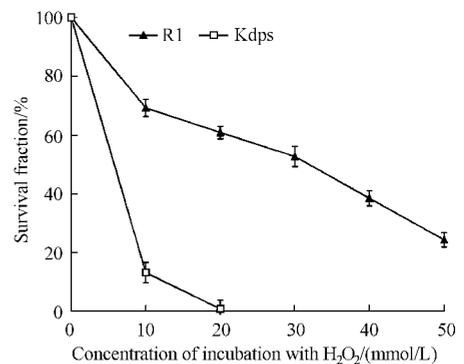


图 1 不同浓度 H_2O_2 条件下野生型 R1 和突变株 *Kdps* 的生存率比较

Fig. 1 Survival curves for wild type R1 and *dps* gene function-deficient mutant *Kdps* following exposure to H_2O_2 . Values are means obtained

急剧降为不足 1%，这一浓度下，对照 R1 比 *K_{dps}* 突变株大约高出 60 倍。在高浓度 H_2O_2 ($\geq 30\text{mmol/L}$) 压力条件下，经过处理的突变株 *K_{dps}* 已经不能正常生长，而野生型菌株 R1 仍有 24.3% ~ 52.7% 的高存活率。由此可见，稳定生长期内，*dps* 基因的缺失导致突变株 *K_{dps}* 对不同浓度 H_2O_2 的敏感度明显增加，高浓度条件下表现尤为显著。说明 *dps* 基因在 DR 菌体内对该菌的抗氧化机制可能起着非常重要的作用。

2.3 *dps* 缺失对 DR 菌过氧化氢酶活性的影响

过氧化氢酶 (catalase) 作为 DR 菌抗氧化体系的重要成员，参与了细胞体内的抗氧化反应^[6]。为分析 *dps* 基因缺失对 DR 菌其它抗氧化物的影响，我们对稳定生长期该菌的过氧化氢酶 (KatA 和 KatB) 活性进行了研究。图 2 为细菌裂解液上清经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后过氧化氢酶的活性染色图及密度扫描结果。由图 2-A 可见，稳定生长期突变株体内 KatA 的活性较野生型 R1 均有不同程度的上调 (无论是否有 H_2O_2 压力)，最大差异达 2.3 倍。虽然 KatB 活性在未处理的突变株与野生型中不存在明显差异，但在 H_2O_2 处理条件下，KatB 的酶活性差异在两者间高达 2.6 倍 (图 2-B)。结果表明 *dps* 基因的缺失会导致氧化压力条件下过氧化氢酶的活性明显增加。

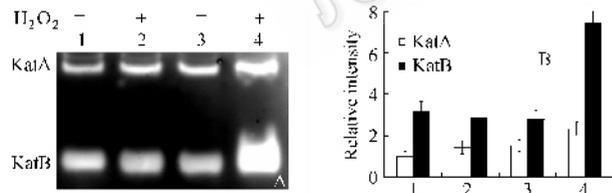


图 2 *dps* 缺失对稳定生长期 *D. radiodurans* 体内过氧化氢酶活性的影响

Fig.2 Effects of *dps* knockout on catalase activities of *D. radiodurans* in stationary growth phase. A: Native-PAGE analysis of catalase activity. B: Enzyme activity quantification. The enzyme activity of KatA in parental R1 strain without treatment of H_2O_2 was assigned as 1.0. The relative intensities from three independent scans are presented as means \pm SD. 1. Wild type R1 sample (without H_2O_2 treatment); 2. Wild type R1 sample treated with 20mmol/L H_2O_2 ; 3. *K_{dps}* mutant sample (without H_2O_2 treatment); 4. *K_{dps}* mutant sample treated with 20mmol/L H_2O_2 . Each sample contains 80 μ g of total protein.

2.4 *Dps* 重组蛋白的表达和纯化

为研究 *Dps* 蛋白的功能，我们通过 PCR 的方法获得 *dps* 全基因产物 (图 3-A)，测序结果表明该片段

与目的基因序列完全一致。构建 *Dps* 蛋白在大肠杆菌中的表达菌株 BL21-*dps*，体外 IPTG 诱导表达的结果表明该重组蛋白在大肠杆菌中具有较高的可溶性。通过金属螯合亲和层析的方法进一步对该蛋白进行分离和纯化，结果如图 3-B 所示，电泳图谱中显示目的蛋白分子量约 30.9kDa，与预测大小相一致。

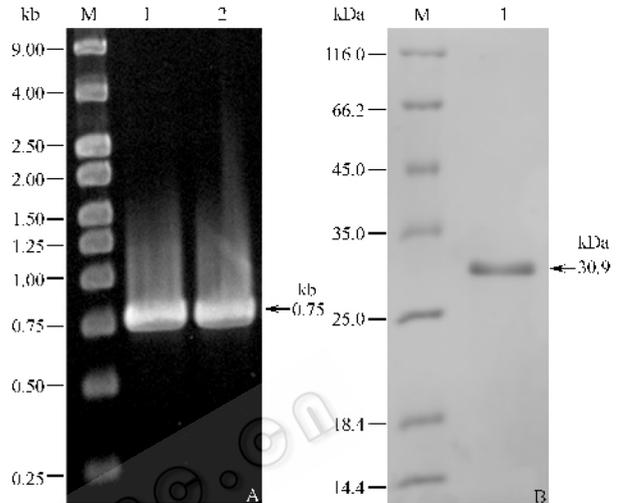


图 3 *dps* 基因的体外克隆和蛋白纯化

Fig.3 PCR-amplified *dps* gene and the recombinant protein of *Dps* analyzed by 12% SDS-PAGE. A: *dps* gene PCR product analyzed by agarose electrophoresis. M. DNA ladder; 1 and 2. PCR amplified product. B: The recombinant protein of *Dps* analyzed by 12% SDS-PAGE. M. Protein ladder; 1. The purified recombinant protein of *Dps*.

2.5 *Dps* 体外 DNA 结合和保护试验

关于 *Dps* 蛋白是否具有 DNA 结合功能在不同的细菌中有不同结果的研究报道。我们采用体外 DNA 结合和保护实验对其功能进行了研究，并通过

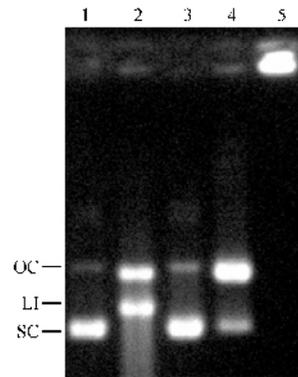


图 4 *Dps* 蛋白体外 DNA 结合和保护试验

Fig.4 DNA binding and protection by *Dps* protein in *in vitro* assay. 1. pUC19 plasmid DNA alone (control); 2. pUC19 exposed to $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ and H_2O_2 ; 3. pUC19 plasmid DNA alone; 4. pUC19 exposed to $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ and H_2O_2 after incubated with 0.5 μ g *Dps* protein. 4. pUC19 exposed to $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ and H_2O_2 after incubated with 0.5 μ g *Dps* protein.

分析质粒 DNA 超螺旋(完整 DNA 分子)、开环(单链断裂)和线性(双链断裂)3种形态的变化对 Dps 蛋白的 DNA 保护能力进行了探讨。如图 4 所示,未加 Dps 蛋白保护的 pUC19 质粒由于 H_2O_2 和 Fe^{2+} 发生 Fenton 反应,产生羟自由基攻击 DNA 而导致剧烈的损伤,构型由超螺旋(SC)DNA 全部变成开环(OC)DNA 和线性(LI)DNA。而当 Dps 蛋白/DNA 质量比为 1 孵育后再加入 Fenton 反应条件时,与处理(第 2 泳道)比较发现 DNA 损伤明显降低,线性 DNA 损伤消失而超螺旋 DNA 比例明显增加(第 4 泳道);当 Dps 蛋白/DNA 质量比达到 4 时,质粒 DNA 与 Dps 蛋白形成高分子量的蛋白-DNA 复合体且样品全部滞留在上样孔(第 5 泳道)。实验结果表明,DR 菌中该 Dps 蛋白具有较强的 DNA 结合能力,而且能保护 DNA 免受 H_2O_2 和 Fe^{2+} 产生 Fenton 反应的损伤,具有显著的保护作用。

3 讨论

大量的研究表明,各种辐射会引起细胞内水辐解,生成多种具有高度细胞毒性作用的活性氧自由基(ROS)攻击生物大分子,可导致细胞内蛋白失活、DNA 链断裂和含有大量不饱和脂肪酸细胞膜的损伤,从而造成细胞的死亡^[4]。因而,ROS 的清除能力和抗氧化保护机制对维持生物体内环境的稳定性及免受氧化损伤具有重要意义。耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)以其极端的逆境抗性机制及其潜在的应用前景(如放射性环境污染修复等)吸引各国科学家的极大关注^[18]。研究显示,DR 菌除了具有高效的 DNA 损伤修复系统外,由酶类和非酶类两大系统构成的抗氧化防御体系对该菌的极端抗性有重要贡献^[5]。Dps 蛋白是原核生物特有的一类抗氧化功能相关的蛋白,它具有结合游离态亚铁离子并能抑制细胞内过量的 Fe^{2+} 和 H_2O_2 发生 Fenton 反应^[12]。为了解 Dps 蛋白(DRB0092)在 DR 菌抗氧化体系中的作用,我们对该基因的功能及潜在的抗氧化分子机理展开了初步研究。

本研究首次对 DR 菌中 DRB0092 基因进行缺失突变,成功获得 *dps* 基因缺失突变株。对突变株进行 H_2O_2 处理,结果发现 *dps* 基因的缺失导致 DR 菌对 H_2O_2 的敏感性急剧增加,且高浓度($\geq 30\text{mmol/L}$)下产生致死效应。Native-PAGE 活性染色结果显示,*dps* 基因的突变致使 DR 菌中过氧化氢酶的活性上

调明显, H_2O_2 压力条件下差异尤为显著。可能是由于 *dps* 基因的缺失导致 DR 菌体内游离态铁的动态平衡失调, H_2O_2 压力下引发 Fenton 反应产生大量的自由基导致。尽管过氧化氢酶的活性也有相应的上调,但这并不能完全消除 Dps 蛋白缺失所引起的 DNA 损伤和酶的失活,最终导致突变株 *Kdps* 对高浓度 H_2O_2 产生致死效应,该结果表明抗氧化蛋白和抗氧化的酶类物质可能通过不同的机制在 DR 菌体内发挥作用。Dps 蛋白体外 DNA 结合和保护试验进一步证明,Dps 蛋白作为 DR 菌体内抗氧化机制的重要成员,能有效结合游离亚铁离子及维持细胞内铁离子的动态平衡,消除 Fe^{2+} 和 H_2O_2 发生反应而对细胞产生的损伤,并能和 DNA 形成致密结构的蛋白-DNA 复合体,保护 DNA 免受自由基的攻击。综上所述,作为防御体系的关键一环,Dps 蛋白在抵御细胞氧化压力方面具有重要作用,它与过氧化氢酶(KAT)等酶类物质和 Deinoxanthin 色素等非酶类物质共同组成了 DR 体内的抗氧化体系。本研究对深入理解抗氧化机制在 DR 菌中的作用,为进一步揭示该菌的极端抗性机制提供了重要证据。

参 考 文 献

- [1] Anderson A, Nordan H, Cain R, 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 JR, Earl AM, Park MJ. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol*, 1999, **7**(9): 362 - 365.
- [3] 华跃进,高冠军.耐辐射异常球菌 DNA 损伤与修复相关基因的比较基因组研究. *微生物学报*, 2003, **43**(1): 120 - 126.
- [4] Ghosal D, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, et al. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29**(2): 361 - 375.
- [5] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, 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.
- [6] Markillie LM, Varnum SM, 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.
- [7] 周绪斌,邢瑞云,吕星.辐射过程中耐辐射奇球菌蛋白酶变化的检测与分析. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 264 - 269.

- [8] 许镇坚, 田兵, 许光治, 等. 耐辐射奇球菌 *crt* I 基因缺失突变株的构建及其功能研究. 微生物学报, 2006, **46**(2): 210 – 213.
- [9] Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, **27**(2–3): 215 – 237.
- [10] Almiron M, Link AJ, Furlong D, et al. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 1992, **6**(12B): 2646 – 2654.
- [11] Gauss GH, Benas P, Wiedenheft B, et al. Structure of the DPS-like protein from *Sulfolobus solfataricus* reveals a bacterioferritin-like dimetal binding site within a DPS-like dodecameric assembly. *Biochemistry*, 2006, **45**(36): 10815 – 10827.
- [12] Zhao G, Ceci P, Ilari A, et al. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2002, **277**(31): 27689 – 27696.
- [13] Wolf SG, Frenkiel D, Arad T, et al. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature*, 1999, **400**(6739): 83 – 85.
- [14] Grove A, Wilkinson SP. Differential DNA binding and protection by dimeric and dodecameric forms of the ferritin homolog Dps from *Deinococcus radiodurans*. *J Mol Biol*, 2005, **347**: 495 – 508.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [16] Lawrence GW, Gilbert AD. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Analytical Biochemistry*, 1986, **157**: 89 – 92.
- [17] Ceci P, Ilari A, Falvo E, et al. Reassessment of protein stability, DNA binding, and protection of *Mycobacterium smegmatis* Dps. *J Biol Chem*, 2005, **280**(41): 34776 – 34785.
- [18] Appukuttan D, Rao AS, Apte SK. Engineering of *Deinococcus radiodurans* R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(12): 7873 – 7878.

Construction of a *dps* mutant and its functional analysis in *Deinococcus radiodurans*

YAN Zhuo-yan, XU Zhen-jian, XU Guang-zhi, TIAN Bing, HUA Yue-jin*

(Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Key Lab of Nuclear-Agricultural Sciences of Ministry of Agriculture, Hangzhou 310029, China)

Abstract : Dps (DNA protection during starvation) is a member of the iron-binding protein family in prokaryotes. It has been shown previously that Dps possesses ferroxidase activity and the ability to sequester iron that seems to protect DNA from oxidative damage. Based on the method of Polymerase Chain Reaction and homologous genetic recombination *in vivo*, the gene (DRB0092) encoding a Dps protein homology in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* was deleted from the wild type strain R1 genome. The obtained mutant was designated as Kdps and further verified by PCR and sequencing. Survival rates of the mutant and wild type strain were investigated after challenged with different doses of hydrogen peroxide (H_2O_2). Results showed that the survival rate of *dps* mutant reduced rapidly under the low concentration of H_2O_2 ($\leq 10\text{mmol/L}$), while the wild type strain showed no sudden decrease. When the H_2O_2 concentration was higher than 30mmol/L , the difference of the survival rates between the mutant and wild type was more than 50-folds. The result demonstrated that the loss of *dps* gene in *D. radiodurans* made cells become more sensitive to oxidative damage. An iron staining method was used to determinate catalase activity in native polyacrylamide electrophoresis gels. The result displayed that two catalases in *dps* mutant were enhanced about 2-folds than that of wild type. The soluble Dps protein was obtained after construction of expression plasmid and inducement in *E. coli* transformant. The Dps protein showed the capacity of DNA binding and protected DNA from hydroxyl free radical cleavage *in vitro*. This study demonstrates that Dps protein of *D. radiodurans* plays an important role in its antioxidant system, which may contribute to its extreme resistance of this bacterium.

Keywords : *Deinococcus radiodurans*; *dps*-mutant; antioxidation; Dps protein; DNA protection

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

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

Received: 21 December 2006/ Accepted: 7 March 2007/ Revised: 18 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>