

耐辐射球菌基因 DRB0099 缺失突变株的构建及逆境分析

常胜合¹, 舒海燕², 陆辉明³, 华跃进³, 李宗伟¹, 田双起¹,
王雁萍¹, 陈林海¹, 谈重芳¹, 秦广雍^{1*}

(¹郑州大学物理工程学院离子束生物工程实验室, 郑州 450052)

(²郑州大学生物工程系, 郑州 450001)

(³浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029)

摘要:耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans* R1)有着极强的辐射抗性。研究其抗辐射的机理对于处理放射性废料有着潜在的应用价值。在耐辐射球菌的基因组中,许多序列的功能未知。其中DRB0099 尤为引人注目。将DRB0099 缺失突变构建该基因的突变株。对野生型和突变体进行比较后发现,在正常生长条件下的前期阶段(0~16 h),突变体生长速度比野生型慢。16 h 以后,野生型逐渐进入稳定生长期。这时,突变株的生长速度高于野生型。但是,野生型的浓度一直高于突变株。表明在DRB0099 被删除后,耐辐射球菌的生长可能受到了阻滞。在紫外线照射的条件下,尽管野生型随着照射剂量的增加,存活率越来越低,但是要比突变体高许多。野生型具有比突变体更强的修复DNA双链断裂的能力。DRB0099 可能直接参与了对DNA的修复。突变体对H₂O₂的敏感程度高于野生型,表明野生型耐辐射球菌在对抗活性氧保护其蛋白质、DNA或者DNA修复方面具有比突变体更强的功能。在低浓度H₂O₂处理条件下,尽管野生型和突变体的存活率都出现下降趋势,但二者的差值并不大。随着H₂O₂剂量的增加,二者的差值越来越大。表明随着活性氧浓度的增加,蛋白质和DNA损伤的数量增加,失去DRB0099 基因功能的突变体比野生型更容易受到损伤。在紫外线照射处理或者H₂O₂处理条件下,DRB0099 能够保护蛋白质和DNA。

关键词:耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans* R1); DRB0099; 突变株

中图分类号: Q938, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0057-06

耐辐射球菌对于电离辐射有着极强的抗性^[1]。研究耐辐射球菌抗辐射的机理对于清除和稳定放射性废料具有重要的潜在应用价值,目前对耐辐射球菌进行工程改造以用于处理辐射污染的研究正在进行^[2]。

高效的DNA修复能力被认为是耐辐射球菌抗辐射的重要原因^[3]。在耐辐射球菌基因组序列中,许多基因被预测可能参与了DNA修复^[4]。但是,耐辐射球菌基因组中功能已知的参与DNA修复的基因的数目比大肠杆菌少许多^[2]。这意味着耐辐射球菌的强辐射抗性可能应归因于功能未知的基因或途径^[5]。

对耐辐射球菌进行辐射处理后发现,操纵子(DRB0098~DRB0100)的表达发生了显著变化^[5],暗示这3个基因可能直接参与了DNA的修复过程。对DRB0098和DRB0100进行突变后发现,野生型与突变体对辐射处理后存活率的差别并不大(另文发表)。DRB0099可能是该操纵子中参与DNA修复的核心成员。本研究详细报道了DRB0099突变体的构建过程,对突变体和野生型在紫外线照射和H₂O₂处理后的存活表现进行了比较。并对DRB0099在耐辐射球菌中的作用进行了讨论。

基金项目: 国家“973项目”(2004CB719604)

*通讯作者。E-mail: qinguangyong@zzu.edu.cn

作者简介: 常胜合(1974-),男,副教授,从事微生物遗传学研究。E-mail: shchang@zzu.edu.cn

收稿日期: 2007-09-24; 修回日期: 2007-10-19

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本文中所用到的菌株和质粒列于表 1。文中用到的基因序列参考已经发表的基因组序列(<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/genome/Page3.spl?database=gdr>)。来自于耐辐射球菌的所有菌株均用 TGY 培养基(0.5% tryptone, 0.3 % yeast extract, and 0.1 % glucose)或者 TGY 平板(1.5% agar)在 30 条件下进行培养。所有的大肠杆菌菌株均用 Luria-Bertani (LB)培养基或者 LB 平板在 37 条件下进行培养。

表 1 本文所用到的菌株和质粒的详细情况
Table 1 Information about the strains and plasmids used in this paper

Strains and plasmids	Description	Reference
D.Radiodurans R1	ATCC13939	[6]
TBK11	As R1 but $\Delta drb0099$	This study
E.Coli JM109	<i>RecA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>)/F, [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lac</i> ¹ , <i>lacZ</i> Δ M15]	TaKaRa Dalian, China (中国, 大连)
PMD19-T Vector		TaKaRa
PRADK		[7]
pTBK		This study
PTBK		This study

1.1.2 主要试剂和仪器: 实验所用紫外灯为LP UV lamp (15 W; Philip)。中央波长为 254nm。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Aor51 H* 和 *Apa* 购自 TAKARA。DNA 测序由北京奥科进行。大肠杆菌感受态细胞为本实验室自备。Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 IPTG 为上海生工产品。DNA ladder、质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。其它生化试剂均购自宝赛生物工程有限公司。

1.2 存活率测定

挑取野生型或者突变体单克隆, 用 TGY 液体培养基 30 条件下进行培养。当 $OD_{600}=1.0$ 时, 取 50 μ L 培养物转接到 500 mL TGY 中继续在 30 条件下进行培养。每 2 h 测 1 次培养物的浓度。所有过程均在无菌环境下进行。所有测量均重复 3 次, 取平均值。

1.3 紫外线照射处理

紫外灯与样品之间的距离为 25cm。从培养平板上挑取单克隆转接到 TGY 培养基中。30 条件下进行培养, 直到 $OD_{600}=0.5$ 。将培养物用 20 mmol/L 磷

酸缓冲液稀释到 10^{-5} 倍。取 10 mL 稀释后的培养物放在直径为 60mm 的玻璃培养皿上进行紫外线照射。照射时间分别为 0、2、4、6、8、10 和 12 min。每个处理重复 3 次。取 100 μ L 照射后的培养物涂布于 TGY 平板上。30 条件下放置 36 h。查数并计算存活率(以照射 0min 的样品为对照进行计算)。

1.4 H₂O₂ 处理

从培养平板上挑取单克隆转接到 TGY 培养基中。30 条件下进行培养, 直到 $OD_{600}=0.5$ 。将培养物用 20 mmol/L 磷酸缓冲液稀释到 10^{-5} 倍。加 H₂O₂ 到稀释后的培养物中, 使其终浓度分别为 0、5、10、20、30 和 40 mmol/L。黑暗环境下放置 1 h, 取 100 μ L 处理后的样品涂布于 TGY 平板上。30 条件下放置 36h。查数并计算存活率(以 0 mmol/L 的样品为对照进行计算)。

1.5 质粒载体的构建

用 PCR 的方法从耐辐射球菌基因组 DNA 中分离基因 DRB0099。引物为 P1: 5'-CTCTACTCTAC-GCAGCAGTGATCC-3' 和 P2: 5'-GTTCCAGATA-GTCGCGGGTGTC-3'。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 50s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min。40 个循环。PCR 产物回收纯化后连接到载体 pMD19-T 上形成载体 pTB。将 pTB 转化到 *E.coli* JM109 中。提取质粒后用 *Aor51 H* 和 *Apa* I 进行双酶切。以 pRADK 为模板, 运用 PCR 的方法分离携带启动子 GroEL 的 Kana 基因。引物为 P3: 5'-ACAGACAGCGCTTAGAAAACTCATC-GAGCATCAAATG-3' (划线部分为 *Aor51 H* 位点) 和 P4: 5'-TTCTAGGGGCCCCGCCAAGCTCGCGA-GGCC-3' (下划线部分为 *Apa* 位点)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 50 sec; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min。40 cycles。PCR 产物回收纯化后用 *Aor51 H* 和 *Apa* 进行双酶切。将双酶切后的 Kana 基因连接到同样双酶切的 pTB 上。连接产物转化到 *E.coli* JM109 中。在含有氨卞青霉素的培养平板上挑取阳性克隆, 培养后提取质粒。用 *Aor51 H* 和 *Apa* 进行双酶切鉴定。将鉴定后的质粒 DNA 转化到耐辐射球菌中。

1.6 耐辐射球菌转化

在 TGY 平板上挑取耐辐射球菌单克隆, 30 条件下震荡培养至 $OD_{600}=0.8$ 。离心去掉上清。用 30 mmol/L CaCl₂ 悬浮沉淀。离心后去掉上清。用 500 μ L 含有 30 mmol/L CaCl₂ 的 TGY 悬浮沉淀。30 条件下震荡培养 90 min。加入 5 μ L 转化质粒。冰上放置 35~40min。加入 5 mL TGY, 在 30 条件下培养 18~20h。取 100 μ L 培养物涂布于含有 30 mg/mL Kanamycin 的 TGY 平板上。30 条件下放置 36h。

2 结果

2.1 DRB0099 的删除

通过对 DRB0099 的序列进行分析发现, DRB0099 内部有 *Aor51 H* 和 *Apa* 两个酶切位点(图 1)。而卡那霉素基因和 pMD19-T 上没有这两个酶切位点。将 DRB0099 克隆到 pMD19-T 上后形成载体 pTB。将酶切后的卡那基因连接到 pTB 上形成 pTBK(图 2-B)。将 pTBK 转化到耐辐射球菌中。运用 P1 和 P2 对转化后的耐辐射球菌基因组 DNA 进行 PCR 反应。对 PCR 产物运用 *Aor51 H* 和 *Apa* 进行双酶切鉴定。如果 DRB0099 基因已经成功地被

卡那基因反向取代, 酶切产物将呈现 1.2kb、900bp 和 780bp 3 个条带(图 2-A)。野生型基因组 DNA PCR 产物酶切后将呈现 900 bp、780 bp 和 360 bp 3 个条带(图 2-A)。电泳结果符合我们的预测, 表明突变体基因组 DNA 中 DRB0099 已经被成功删除(图 2-A)。

2.2 $\Delta drb0099$ 与 R1 生长速度比较

在正常供氧条件下, 起始阶段(0~16h)突变株生长速度比野生型慢(图 3)。从 16 h 开始, 突变株和野生型逐渐进入稳定生长期。此时, 突变株的生长速度高于野生型。除起点外, 突变体在每个时间点的浓度都比野生型低(图 3)。转接培养 2 h 后, R1 的

119769	AGCCGGTGGAGCCGAACGGTCTGAAGCGCCAGGAGCAGTCATGAACCGCA	119720	
119719	AAAACCGTACCGAACAGGCCAGGACACGCTGAACATCCTCCGCACGGGC	119670	
119669	CAGTCCGTCACCGGTTCGGTCCGGTGAGTTGCCGGGTCTCGCGCAAT	119620	
119619	GCGCAAGGCACGCGGCTGTTACGCCGAGCAGGGAGAAGACCTACGAG	119570	
119569	AAGCCTTACGCCGTCGCCGGGCAGCTTTCAGACGACCTGTGAGGTCACG	119520	
119519	TCTGAGACGACGTTTGC GCGCGCGCTCGCTGCGTGAAAAGGCGTCAGC	119470	
119469	ACTCGC <u>AGCGCT</u> CAACTTCGCCTCGCCAAAAACCCCGGTGGCGGTTTTTC	119420	<i>Aor 51 H I</i>
119419	TGGCGCGCGCAGGCCAGGAAGAAGACCTGTGCCGTGGCAGTGGGCTC	119370	
119369	TATTTAGTCTGACCTACCCAGGCCGAGCCTTACTACGCGTCAACCG	119320	
119319	CCAGTCCCACTCGGCGCTCTATAACCGACCACCTCATTTACAGCCCGCAGG	119270	
119269	TCCCATTTTCCGGGATGACGCGGGGCAACTGTTGCCCGCGCCGGTGCCG	119220	
119219	GTGAACATTATACCGCGCGGCCCGAACGCTGGAGCAGTGGCCAGAG	119170	
119169	CCGTCTGAGCAACTGCCGCAGGTGTGCCGACACTGCCGGAACGGGCCC	119120	<i>Apa I</i>
119119	GGCGGGTCTGGGCGTCGCCGCTGGATGGAGCAGACGCATCTGGTGCTG	119070	
119069	GGAGCGTGGGCTGCGGCGTGTCCGCAACGACCCGCGGGCGTGGCAGC	119020	
119019	CACCTCCGCGAGCTGTGAAGGGGAAGCCAGGGCGCTTTTGAGCACG	118970	
118969	TTACTTTCGCCGCTCCTGACAATCATCTCAGCACCCGACGCTCGGCGCG	118920	
118919	TTTCGTCGCGAGCTGGAGTCTTATGCTGCCCTCATCTACCTCCTGACG	118870	

图 1 耐辐射球菌基因 *drb0099* 的基因组序列

Fig.1 The genome sequence of *drb0099*. The starting codon and the stopping codon were shown with grey characters. The enzyme sites were shown with underlines. The numbers showed the gene's position in *Deinococcus radiodurans* R1 plasmid MP1 (Accession number: AE001826).

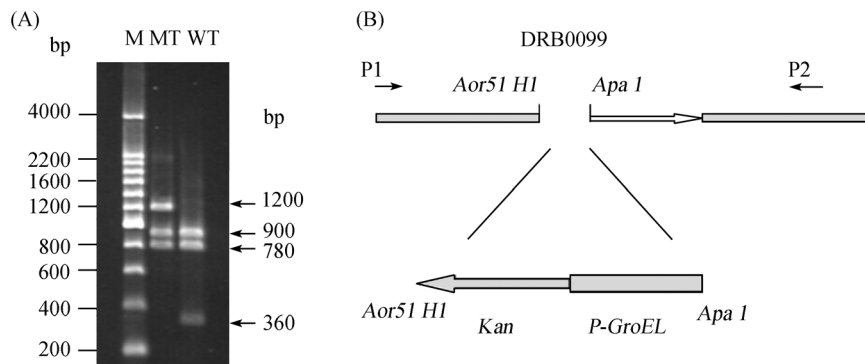


图 2 突变株 $\Delta drb0099$ 的构建和鉴定

Fig. 2 Construction and identification of the mutant $\Delta drb0099$. (A) Identification of *drb0099* deletion by PCR analysis. M was the DNA ladder. MT was the digested result of the mutant $\Delta drb0099$. WT referred to the digested result of the wild type *Deinococcus radiodurans* R1. (B) the framework of the mutant construction.

OD_{600} 是 0.049, drb0099 的 OD_{600} 为 0.045。培养 8h 后, 二者的 OD_{600} 分别为 0.177 和 0.099。培养 10h 后, R1 的浓度几乎是野生型的 2 倍。培养 16h 后, 二者的差距变小。但是突变株的浓度仍然低于相应野生型的浓度。

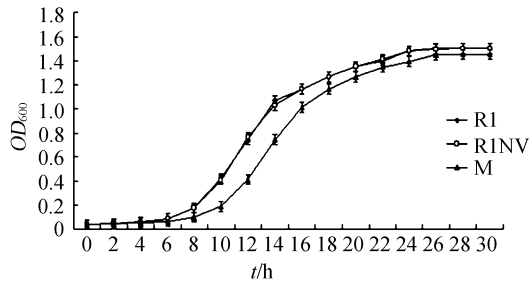


图3 耐辐射球菌 R1 与突变体 (Δ drb0099) 在正常条件下的生长比较

Fig. 3 Growth of wild-type *D. radiodurans* R1 compared to mutant (Δ drb0099) strains under normal condition. R1 was the wild type. R1NV was *D. radiodurans* R1 transformed with net vector. M referred to the mutant (Δ drb0099)

2.3 Δ drb0099 和 R1 对紫外线照射的反应

紫外线照射后, 突变体细胞更容易死亡(图4)。紫外线照射 6 min 后, 75% 的 R1 细胞能够形成克隆(图4)。突变体只有 15% 的细胞能够形成克隆(图4)。照射 14 min 后, 所有的 Δ drb0099 细胞全部死亡, 但是仍然有 R1 细胞在 TGY 平板上出现(图4)。野生型耐辐射球菌具有比 Δ drb0099 更强的抵抗辐射的能力。

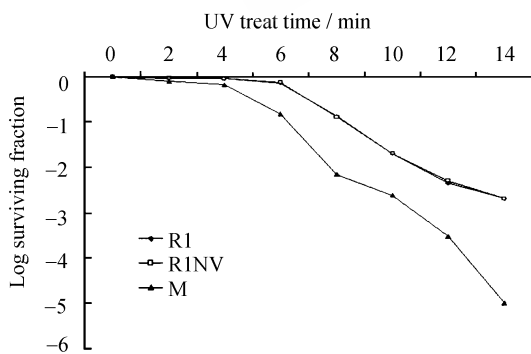


图4 耐辐射球菌 R1 与突变体 Δ drb0099 在紫外线照射条件下的存活比较

Fig. 4 Phenotypic characterization of Δ drb0099 mutant with UV radiation. R1 was the wild type. R1NV was *D. radiodurans* R1 transformed with net vector. M referred to the mutant (Δ drb0099)

2.4 Δ drb0099 和 R1 在 H_2O_2 处理条件下的反应

运用不同浓度的 H_2O_2 对 R1 和 Δ drb0099 进行处理。结果显示 Δ drb0099 对 H_2O_2 的反应更为敏感(图5)。在低浓度 H_2O_2 条件下, 尽管 Δ drb0099 的存活率

低于 R1, 但二者的差别并不大(图5)。例如, 当 H_2O_2 处理浓度是 5 mmol/L 时, R1 的存活率为 99%, drb0099 的存活率为 90%(图5)。随着 H_2O_2 处理浓度的增加, 野生型和突变体存活率的差值越来越大(图5)。当 H_2O_2 处理浓度为 40 mmol/L 时, 几乎所有的 Δ drb0099 细胞在 TGY 培养平板上都不能形成克隆。这时, R1 的存活率仍然有 30%(图5)。

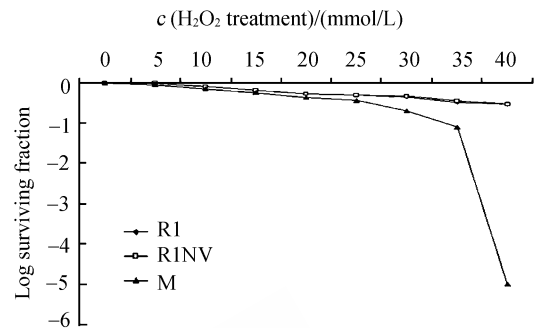


图5 耐辐射球菌 R1 与突变体 Δ drb0099 在 H_2O_2 处理条件下的存活比较

Fig. 5 Phenotypic characterization of Δ drb0099 mutant with H_2O_2 treatment. R1 was the wild type. R1NV was *D. radiodurans* R1 transformed with net vector. M referred to the mutant (Δ drb0099)

3 讨论

耐辐射球菌对辐射的极端抗性与其特殊的细胞结构、染色体排列和 DNA 修复系统紧密相连^[2]。耐辐射球菌基因组中, 许多基因参与了对辐射的抵抗过程^[5]。耐辐射球菌基因组中存在大量功能未知的序列^[4]。耐辐射球菌基因组中功能已经鉴定的参与 DNA 修复的基因数目比大肠杆菌少^[2, 4]。而且耐辐射球菌基因组中功能已经鉴定的基因绝大多数都能够其它原核生物中找到对应的同源片段^[2, 4]。这意味着耐辐射球菌对辐射的极端抗性可能应归因于目前功能尚未鉴定的基因。

在众多功能未知的基因中, DRB0099 与 DRB0098 和 DRB0100 以同一个操纵子的形式出现。辐射处理后, 这 3 个基因的表达发生了显著变化^[5]。实验室构建 DRB0098 和 DRB0100 的突变体后发现, 在辐射处理条件下, 这两个基因的突变体与野生型相比, 存活率并没有发生显著变化(另文发表)。因此推测, 在该操纵子中, DRB0099 可能发挥了重要作用。将 DRB0099 进行删除, 构建该基因的突变体 drb0099。在生长的前期(0~16 h), 突变体生长速度比野生型慢。培养 16h 以后, 野生型逐渐进入稳定生长期。这时, 突变株的生长速度高于野生型。但是, 野

生型的浓度一直高于突变株。表明在DRB0099 被删除后，耐辐射球菌的生长可能受到了阻滞。

紫外线照射能够引起DNA的损伤。在众多DNA损伤中，DNA双链断裂最难修复^[8]。辐射处理后，耐辐射球菌能够在短时间内修复大量的DNA双链断裂^[9~12]。随着紫外线照射时间的增加，尽管野生型的存活率越来越低，但在每个时间点上的存活率都比突变体高。例如，在紫外线照射 6 min后，75%的R1 细胞能够形成克隆。相应突变体的存活率只有 15%。表明野生型比突变体具有更强的修复DNA双链断裂的能力。DRB0099 可能与DNA修复系统有着直接联系。

生物体内活性氧能够通过呼吸链元件的自我氧化^[13~15]或者其它细胞途径^[16]引起氧化胁迫。生物体会发生一系列的胁迫反应以修复氧化胁迫所引发的损伤。最近有研究表明，耐辐射球菌的极端辐射抗性更多地依赖于其能够在辐射条件下保护其蛋白质不受氧化，细胞内二价锰离子浓度增加有助于保护蛋白质不受氧化^[17]。辐射处理对蛋白质造成的氧化损伤可能比对DNA造成的损伤更容易导致细胞死亡。突变体对H₂O₂的敏感程度高于野生型，表明野生型耐辐射球菌在对抗活性氧保护其蛋白质、DNA或者DNA修复方面具有比突变体更强的功能。另一个值得注意的现象是，在低浓度H₂O₂处理条件下，尽管野生型和突变体的存活率都出现下降趋势，但二者的差值并不大。随着H₂O₂浓度的增加，二者的差值越来越大。表明随着活性氧浓度的增加，蛋白质和DNA损伤的数量增加，失去DRB0099 基因功能的突变体比野生型更容易受到损伤。DRB0099 可能参与了耐辐射球菌细胞内锰离子的转运过程，在紫外线照射处理或者H₂O₂处理条件下，诱导二价锰离子浓度增加，抵抗活性氧保护蛋白质和DNA。

参 考 文 献

[1] Battista JR, Rainey FA, Family L. Deinococcaceae. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1, 2nd ed. New York: Springer. 2001, pp. 395-414.

[2] Kira SM, L aravind, Yurii W, *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(1):

44-79

[3] Tomoo F, Issay N, Masahiro K, *et al*. Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutation Research*, 1999, 435: 151-161.

[4] Owen W, Jonathan AE, John FH, *et al*. Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*, 1999, 286: 1571-1577.

[5] Yongqing L, Jizhong Z, Marina VO, *et al*. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *PNAS*, 2003, 100(7): 4191-4196

[6] Anderson AW, Nordon HC, Cain RF, *et al*. Studies on a radio-resistant micrococcus. I, Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.*, 1956, 10: 575-578.

[7] Gao G, Lu H, Huang L, *et al*. Construction of DNA damage response gene *ppr1* functiondeficient and function complementary mutants in *Deinococcus radiodurans*, *Chinese Sci. Bull*, 2005, 50: 311-316.

[8] Marples B. Is low-dose hyper-radiosensitivity a measure of G2-phase cell radiosensitivity? *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004, 23: 197-207

[9] Daly MJ, Ling O, Minton KW. Interplasmidic recombination following irradiation of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 7506-7515.

[10] Daly MJ, Ouyang L, Fuchs P, *et al*. In vivo damage and *recA*-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.*, 1994, 176 (12): 3508-3517.

[11] Daly MJ, Minton KW. Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.*, 1995, 177: 5495-5505.

[12] Daly MJ, Minton KW. An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.*, 1996, 178: 4461-4471.

[13] Gonzalez-Flecha B, Demple B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 13681-13687.

[14] Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266: 6957-6965.

[15] Messner KR, Imlay JA. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 10119-10128.

[16] Seaver LC, Imlay JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem.*, 2004, 279: 48742-48750.

[17] Michael JD, Elena KG, Vera YM, *et al*. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *Plos Biology*, 2007, 5(4): 0769-0779

Construction of the gene *drb0099* deleted mutant and adversity analysis in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*

Shenghe Chang¹, Haiyan Shu², Huiming Lu³, Yuejin Hua³, Zongwei Li¹, Shuangqi Tian¹, Yanping Wang¹, Linhai Chen¹, Zhongfang Tan¹, Guangyong Qin^{1*}

(¹*Ion Beam Bio-engineering Lab, School of Physics, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China*)

(*The Department of Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China*)

(²*Institute of Nuclear-Agricultural Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract: *Deinococcus radiodurans* R1 has extraordinary resistance to radiation. DRB0099 might play an important role in protecting the bacterium against radiation. To verify the inference, we deleted *drb0099* and constructed the mutant. Comparing with the wild type, the mutant grew more slowly in the beginning cultivation stage (0~16 h) under normal conditions. After being cultivated for 16 h, the mutant grew faster than the wild type. The biomass concentration of the wild type was always higher than that of the mutant. The mutant cell's fission during the growing phase might be blocked. When treated with UV, although *Deinococcus radiodurans* R1 cultures' survival fraction was lower with UV treatment time increased, the survival fraction was much higher than that of Δ *drb0099*. The wild type could repair DNA double strands breaks better than the mutant. The gene *drb0099* might directly relate with the DNA repair system. The mutant was more sensitive to H₂O₂ than the wild type. The wild type could better protect protein and DNA against reactive oxygen species (ROS) or in DNA repair. When treated with low concentration of H₂O₂, although the survival fraction of both R1 and the mutant decreased, the difference was small. However, with the concentration of H₂O₂ increased, the difference value increased. The mutant without *drb0099* was more easily injured than the wild type with ROS increased. Under UV or H₂O₂ treatment, DRB0099 could protect protein and DNA from oxidation.

Keywords: *Deinococcus radiodurans* R1; *drb0099*; mutant

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719604)

*Corresponding author. E-mail: qinguangyong@zzu.edu.cn

Received: 24 September 2007/Revised: 19 October 2007