مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

کلونینگ، بیان و ارزیابی عملکرد ژن *PprI* *دینوکوکوس رادیودورانس* در *اشریشیا کلی*

امیر میرزایی[۱]، جلیل فلاح مهرآبادی[۲]، نور امیر مظفری[۳]، طاهر نژاد ستاری[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران ایران.

۲. پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۶/۳۰

پذیرش:۱۳۹۲/۸/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۲۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1392; 7(4): P 24-29

نویسنده مسئول:

جلیل فلاح مهرآبادی

پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۲۲۹۷۴۶۰۹

پست الکترونیک:

Jalil.fallah@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: ژن PprI یکی از ژن‌های جدید شناخته‌شده در باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* می‌باشد که نقش اساسی در ترمیم DNA و مقاومت این باکتری نسبت به اشعه ماورای بنفش دارد. هدف این مطالعه کلون، بیان و بررسی خصوصیات ژن *PprI* در *اشریشیاکلی* می‌باشد.

مواد و روش کار: ژن *PprI* باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* در حامل کلونینگ pGEM به‌صورت سنتتیک ساخته‌شده و در وکتور pET21a ساب‌کلون گردید. حامل پلاسمید بیانی pET21a حاوی ژن *PprI* در *اشریشیاکلی* سویه Origami ترانسفورم گردید و بیان پروتئین با استفاده از SDS-PAGE و وسترن-بلات بررسی شد. همچنین میزان مقاومت به اشعه UV-C در باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب تعیین شد.

یافته‌ها: در این مطالعه وکتور *pET21a* حاوی ژن *PprI* به همراه دم انتهایی هیستیدینی ساخته شد و شرایط بهینه برای بیان پروتئین نوترکیب *PprI* تعیین گردید. همچنین *اشریشیا کلی* نوترکیب نسبت به سویه فاقد ژن *PprI* به اشعه *UV-C* مقاوم‌تر شده بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین نوترکیب*PprI* می‌تواند گزینه مناسبی به‌عنوان پروتئین مقاوم به پرتو باشد. همچنین می‌توان پروتئین تولیدشده را خالص‌سازی کرده و میزان مقاومت به اشعه *UV-C* را در سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی نیز بررسی نمود.

کلمات کلیدی : مقاومت به اشعه UV-C، *دینوکوکوس رادیودورانس*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اشعه ماورای بنفش (UV) به سه صورت UV-A، UV-B و UV-C یافت می‌شود و UV-A دارای سطح انرژی کم بوده و از طول موج ۳۱۵ تا ۴۰۰ nm می‌باشد. UV-B دارای طول موج کمتر (۲۸۰-۳۲۰ nm) می‌باشد و UV-C دارای طول موج کمتر از ۲۸۰ نانومتر می‌باشد و دارای بیشترین میزان انرژی بوده و باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها می‌شود. اشعه ماورای بنفش باعث ایجاد رادیکال‌های سمی اکسیژن شده و باعث تغییر در ساختار DNA به‌صورت جهش و دایمر تیمین می‌شود. همچنین، اشعه UV باعث اثرات مضر همانند تضعیف سیستم ایمنی، درماتیت و درنهایت سرطان پوست در انسان می‌شود.

مقاومت به اشعه‌ی الکترومغناطیسی در برخی از ارگانیسم‌ها که باکتری‌های اکستریموفیل (Extremophile) نام دارند، وجود دارد (۱-۴). باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* یکی از باکتری‌های اکستریموفیل است که به بسیاری از عوامل استرس‌زا از قبیل اشعه‌ی الکترومغناطیسی، پراکسید هیدروژن و خشکی مقاوم است. باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* در فاز رشد لگاریتمی در دوز ۲۰۰J/m^2 نور UV-C که باعث به وجود آمدن ۵۰۰۰ پریمیدین دایمر در DNA می‌شود، به حیات خود ادامه می‌یابد و ۸۵٪ سلول‌های باکتریایی بعد از مدت ۲ سال در حضور مقادیر کمتر از ۵٪ رطوبت زنده می‌مانند (۵). اشعه ماورای بنفش، فوتون‌هایی هستند که مولکول‌های سلولی را تغییر می‌دهند و

رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار فعال (ROS) Reactive Oxygen Species تولید می‌کنند. این رادیکال‌های آزاد به‌طور مستقیم و غیرمستقیم باعث تخریب DNA می‌شوند و تغییرات بازی، شکست‌های دو رشته و تک‌رشته‌ای DNA را به وجود می‌آورند (۶،۷). این باکتری می‌تواند ژنوم خود را در مقابل آسیب‌های زیاد شکستگی DNA ترمیم کند که باکتری‌های دیگر فاقد این خصوصیت هستند. همانند سایر باکتری‌های مقاوم به اشعه، *دینوکوکوس رادیودورانس* راهبردهای متفاوتی را برای غلبه به اشعه ماورای بنفش دارد (۸،۹). مکانیسم کلی مقاومت به اشعه در این باکتری هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است، اما مطالعات نشان می‌دهد که این باکتری دارای ژنوم سخت حلقوی، سیستم ترمیمی قوی DNA و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌باشد که بیومولکول‌ها را از آسیب‌های ناشی از ROS محافظت می‌کند (۱۰). هم‌چنین تعدادی زیادی ژن در مقابله با استرس اشعه UV در این باکتری وجود دارد که در میان این ژن‌ها، اخیراً ژن *PprI* مورد شناسایی قرارگرفته است که سیستم تنظیمی باکتری در سیستم‌های ترمیمی DNA، پاسخ به استرس، متابولیسم تولید انرژی، تنظیم رونویسی، سیگنال ترانسداکسیون و سیستم‌های چاپرون در مقابله به اشعه UV را به راه می‌اندازد (۱۱). مطالعات نشان می دهد که تخریب ژن *PprI* در باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* باعث کاهش میزان مقاومت این باکتری نسبت به اشعه UV می‌شود به‌طوری‌که تخریب این ژن باعث حذف سایر مسیرهای تنظیمی درگیر در مقاومت به اشعه و ترمیم DNA نیز می‌شود، بطوریکه DNA ترمیم نشده و از بین می‌رود (۱۲). مطالعات اخیر، درزمینه تأثیر ژن‌های مقاومت باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* در سایر میزبان‌ها در حال انجام می‌باشد و مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های *دینوکوکوس رادیودورانس* که به اشعه گاما مقاومت دارند، ممکن است به سایر اشعه ازجمله ماورای بنفش نیز مقاومت داشته باشند. در ایران تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی ژن‌های مقاوم به اشعه بخصوص اشعه UV-C صورت نگرفته است و به همین دلیل کلونینگ ژن مقاوم به پرتو *PprI* در *اشریشیاکلی* و ارزیابی بیان آن هدف این مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

ترانسفورم وکتور pGEM حاوی ژن *PprI* در *اشریشیاکلی* DH5α و ساب کلونینگ آن در pET21a:

در این مطالعه، ژن *PprI* دارای برچسب هیستیدینی به‌صورت سنتتیک در وکتور pGEM توسط شرکت Bioneer کره سنتز شد، بطوریکه سایت‌های برش آنزیمی *EcoRI* و *NdeI* در دو طرف آن طراحی‌شده بود. در ابتدا وکتور pGEM به سلول مستعد *اشریشیاکلی* DH5α ترانسفورم شد. به دنبال آن پلاسمید pGEM ترانسفورم شده با کیت استخراج پلاسمید (Bioneer, Korea) استخراج و توسط دو آنزیم *EcoRI* و *NdeI* (Fermentas، Lituania) مورد هضم آنزیمی قرارگرفته و ژن *PprI* موجود در آن توسط استخراج از ژل جداسازی شد. با کمک آنزیم T4 DNA ligase، عمل اتصال (Ligation) ژن *PprI* با وکتور pET21a در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام گرفت و به دنبال آن، محصول واکنش اتصال (Ligation mix) به سلول *اشریشیاکلی* DH5α ترانسفورم و بر روی محیط LB agar حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. به دنبال آن، کلنی‌های رشد یافته به‌عنوان کلون-های واجد وکتور و احتمالاً واجد قطعه ژنی موردنظر انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژنی موردنظر در وکتور pET21a، کلنی‌های رشد یافته به‌صورت تصادفی انتخاب و پس از انجام عمل استخراج پلاسمید، توسط ژل الکتروفورز بررسی شدند و تائید قرارگیری قطعه ژنی موردنظر، به‌وسیله هضم آنزیمی با *EcoRI* و *NdeI* انجام گرفت. درنهایت با عمل توالی یابی که توسط مرکز ماکروژن کره جنوبی انجام شد، صحت کامل توالی ژن *PprI* کلون شده و قرارگیری صحیح آن بررسی شد. پس از تائید کلون سازی، وکتور pET21a حامل ژن موردنظر به سویه بیانی *اشریشیاکلی* سویهOrigami ترانسفورم شد.

بیان ژن *PprI* در *اشریشیا کلی* سویه Origami

۰/۵ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری *اشریشیا کلی* سویه Origami واجد پلاسمید نوترکیب را در ۵ میلی‌لیتر از محیط LB broth جدید (حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین) کشت داده شد و پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ رسید، در این زمان ۰/۱ میلی‌مولار IPTG اضافه شد تا عمل القا صورت گیرد. پس از ۴ ساعت، یک میلی‌لیتر از کشت برداشته‌شده و با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ

شد. به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه (Sample buffer) اضافه گردید و چند دقیقه ورتکس شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش بن‌ماری گذاشته شد و پس از سانتریفوژ با دور بالا، از مایع رویی برای انجام الکتروفورز SDS و بررسی بیان استفاده شد و درنهایت میزان بیان توسط رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو بررسی شدند.

آنالیز وسترن‌بلات پروتئین تولیدشده

انتقال پروتئین‌ها از ژل SDS-PAGE به یک غشا نیتروسلولزی با استفاده از بافر تریس-گلیسین همراه با ۲۰٪ متانول صورت گرفت. جایگاه‌های غیراختصاصی توسط توئین ۲۰ بلوکه شدند و غشا ۳ بار توسط T-BST (Tris- Buffered Saline and Tween 20) شسته شدند و سپس ۱ تا ۲ ساعت در آنتی‌بادی 6His-tag کونژوگه با HRP peroxidase (Roche, Germany) قرار گرفت. غشا مجدد شسته شده و توسط محلول سوبسترای 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) و ۱٪ پراکسید هیدروژن مجاور شد. با پیدایش باند قهوه‌ای، غشا با آب مقطر شستشو داده‌شده تا واکنش آنزیمی متوقف شود و نتایج بعد از خشک شدن غشا خوانده شد.

بررسی میزان بقای *اشریشیاکلی* نوترکیب بعد از اشعه UV-C

سلول‌های *اشریشیا کلی* نوترکیب در فاز رشد لگاریتمی، برای بررسی میزان بقا بعد از اشعه UV-C مورداستفاده قرار گرفت. سلول‌ها ابتدا در بافر PBS به‌صورت سوسپانسیون درآمده و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون در دمای اتاق با UV-C دارای طول موج ۲۶۰nm و با دوز ۲۰۰J/m^2 اشعه دهی شدند. بعد از تیمار با اشعه، سوسپانسیون موردنظر به محیط کشت LB agar منتقل‌شده و میزان بقای سلول‌ها بعد از اشعه دهی با بررسی شدند. لازم به ذکر است که سویه‌های *اشریشیا کلی* فاقد ژن *PprI* به‌عنوان کنترل منفی مورداستفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

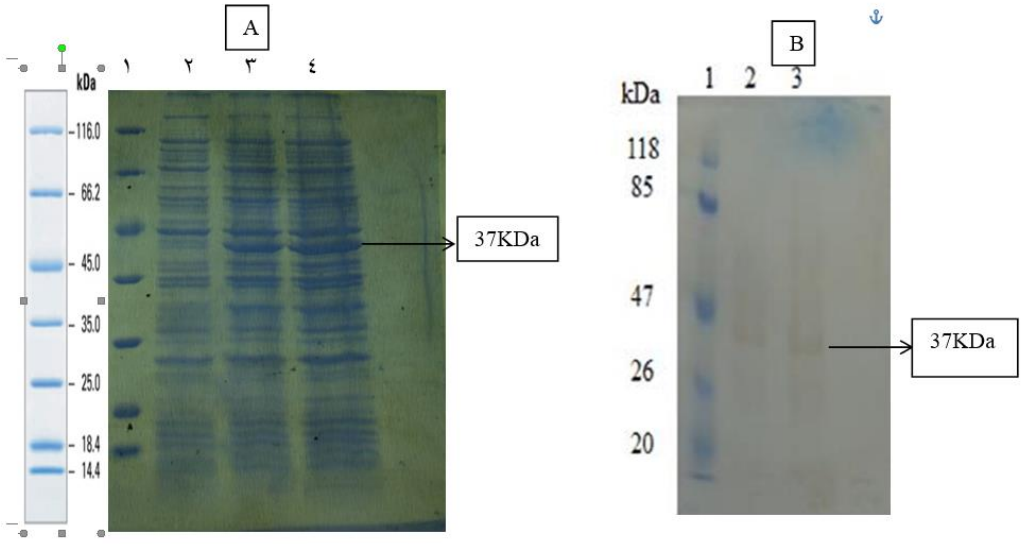
پس از ترانسفورم مخلوط لیگاسیون وکتور pET21a و قطعه ژنی موردنظر به سلول *اشریشیا کلی* Origami، وجود وکتور نوترکیب حامل ژن موردنظر توسط استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی مشخص شد. نتیجه هضم آنزیمی نشان داد که قطعه موردنظر ازلحاظ اندازه با ژن هدف همخوانی دارد. (حدود ۱۰۱۷ جفت باز). برای آنالیز بیشتر، وکتورهای تائید شده برای توالی‌یابی فرستاده شد که توالی‌ها با نرم‌افزار MEGA5 تطابق داده شد و نتایج نشان داد که توالی ژن توالی یابی شده با توالی ژن موردنظر همخوانی دارد.

بیان ژن *PprI* در *اشریشیا کلی* Origami

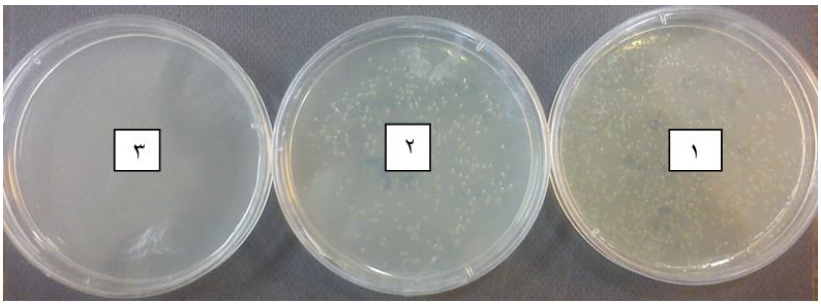
کلون‌های باکتری در دو مرحله قبل و بعد از القا جمع‌آوری‌شده و پس از لیز سلول‌ها، پروتئین‌های آنها روی ژل SDS-PAGE موردمطالعه قرار گرفت که نتیجه آن در شکل ۱a آمده است. در نمونه‌های قبل از القا باند ۳۷ کیلو دالتون مشاهده نشد، ولی در نمونه‌های بعد از القا، باند پروتئینی ۳۷ کیلو دالتونی مشاهده شد که وجود مارکر پروتئینی آن را تائید می‌کند (شکل ۱a). هم‌چنین بیشترین بیان در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار IPTG به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده شد. برای تائید محصول پروتئینی از روش وسترن‌بلات استفاده شد که نتیجه آن در شکل ۱b مشاهده می‌شود که باند قهوه‌ای ۳۷ کیلو دالتون ظاهرشده است.

بررسی میزان بقای *اشریشیاکلی* در مقابل اشعه UV-C

برای بررسی میزان بقای *اشریشیاکلی*، وکتور pET21a نوترکیب حاوی ژن موردنظر به *اشریشیاکلی* ترانسفورم و القا شد (OD=0.4) و بعد از گذشت ۳ ساعت (OD=0.9) سوسپانسیون با دوز ۲۰۰J/m^2 از اشعه UV-C با طول موج ۲۶۰nm تیمار شدند، بطوریکه ابتدا از سلول‌های *اشریشیا کلی* واجد ژن *PprI* و سلول-های فاقد ژن *PprI* رقت تهیه شد و با محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شد و به دنبال آن تحت تأثیر اشعه UV-C قرار گرفتند. همان‌طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، سلول‌های *اشریشیاکلی* حاوی ژن *PprI* از مقاومت نسبی نسبت به اشعه UV-C برخوردار بوده و پس از محاسبه تعداد باکتری‌های اولیه، تعداد سلول‌های رشد یافته بر روی محیط کشت و مقایسه آن با سلول‌های اشعه نخورده، میزان بقای سلولی موردمحاسبه قرار گرفت و نتیجه این بود که حدود ۲۰٪ از سلول‌های حاوی ژن *PprI* نسبت به اشعه UV-C با طول موج ۲۶۰ nm و با دوز ۲۰۰ j/m^2 مقاومت نشان دادند.



شکل A.١ : (چپ) ژل مربوط به SDS-PAGE نمونه‌های قبل از القا و بعد از القا. چاهک ١: Ladder پروتئین، چاهک ٢: نمونه قبل از القا، چاهک ٣ و ٤: نمونه‌های بعد از القا B: (راست): وسترن‌بلات نمونه‌های پروتئینی. چاهک ١: Ladder پروتئینی، چاهک ٢ و ٣: وسترن‌بلات نمونه‌های مثبت.



شکل ٢. نتایج بقای سلول‌های *اشریشیا کلی* بعد از تیمار با اشعه UV-C با دوز J/m^2 ٢٠٠. ١: سلول *اشریشیا کلی* حاوی ژن *PprI* اشعه نخورده، ٢: سلول *اشریشیا کلی* حاوی ژن *PprI* اشعه زده‌شده، ٣: سلول *اشریشیا کلی* فاقد ژن *PprI* اشعه زده‌شده.

بحث

باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* یکی از باکتری‌های فاقد اسپور است که دارای مقاومت به اشعه‌ی یونیزان و عوارض متعاقب آن یعنی شکستگی‌های DNA می‌باشد، بطوریکه دارای ١٠ کپی از ژنوم خود دارد. این باکتری از مکانیسم نوترکیبی هومولوگ برای ترمیم DNA خود استفاده می‌کند (**١٣**). مطالعات نشان می‌دهد که ژنوم این باکتری دارای ٣١٨٧ قالب خواندن باز Open Reading Frames (ORFs)است اما فقط ١۴٩٣ پروتئین کد شده از آنها با ساختار پروتئین‌های موجود در بانک اطلاعات پروتئینی Protein Data Bank(PDB) مطابقت دارد و سایر پروتئین‌های آن دارای عملکرد ناشناخته است (**١۴**). اخیراً برخی از این پروتئین‌ها مورد شناسایی قرارگرفته‌اند که در مقاومت این باکتری به اشعه دخالت دارند. یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین *PprI* می‌باشد که مسئول حفاظت‌بخشی *دینوکوکوس رادیودورانس* به اشعه ماورای بنفش است. مطالعات نشان می‌دهد که این پروتئین دارای خاصیت تنظیمی بوده و دو موتیف ساختاری و عملکردی دارد و منحصراً در باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* یافت شده است (**١۵**). مطالعه بیان ژن *PprI* تأثیر آن بر روی سایر پروتئین‌های با استفاده از روش Real-time PCR و موتاسیون‌زایی با ترانسپوزون نشان داد که خاصیت تنظیمی پروتئین PprI به نحوی است که سایر پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان و دخیل در ترمیم DNA مانند recA، PprA و کاتالاز را نیز فعال

می‌کند (**۱۶**). ساختار حلقوی سخت ژنوم و سیستم‌های ترمیم DNA فعال‌شده توسط پروتئین PprI مسیر مهم دیگر در حفاظت‌بخشی سلول‌های *دینوکوکوس رادیودورانس* در مقابل اشعه می‌باشد (**۱۷**). نتایج مطالعه ما نیز نشان می‌دهد که پروتئین PprI می‌تواند حفاظت‌بخشی نسبی در سلول‌های *اشریشیا کلی* نسبت به اشعه UV-C با طول موج ۲۶۰ nm و دوز ۲۰۰ J/m^2 ایجاد کند و با سایر مطالعات انجام‌گرفته در این زمینه مطابقت دارد. Gao و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به‌منظور بررسی تأثیر ژن *PprI* در *اشریشیا کلی*، این ژن را در سویه *اشریشیا کلی* TG1 بیان کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های بیان‌کننده ژن *PprI* تقریباً حدود ۱/۶ برابر نسبت به سلول‌های فاقد این ژن نسبت به اشعه گاما مقاومت دارند و همچنین *اشریشیا کلی* بیان‌کننده این ژن، سایر ژن‌های مسیر ترمیم DNA را نیز فعال می‌کند. (**۱۸**). ژن *PprI* نیز می‌تواند در میزبان‌های یوکاریوتی نیز عمل کرده و مقاومت سلول‌های یوکاریوتی را نسبت به استرس‌ها بیشتر کند بطوریکه Pan و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که گیاه نوترکیب *Brassicanapus* حاوی ژن *PprI* نسبت به استرس نمکی، گرما، اشعه UV و گاما و اسمز مقاومت دارد (**۱۹**).

مطالعات نشان می‌دهد که حذف ژن *PprI* در باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* تأثیر بسزایی در میزان مقاومت این باکتری به اشعه دارد بطوریکه سویه‌های فاقد ژن *PprI* بسیار حساس به اشعه UV و اشعه‌ی یونیزان هستند. Guanjun و همکارانش در سال ۲۰۰۶ موتانت‌هایی از *دینوکوکوس رادیودورانس* که فاقد ژن *PprI* بودند را ایجاد نمودند و با گروه کنترل که حاوی ژن *PprI* بود، مورد مقایسه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین PprI پس از اشعه دادن به باکتری به DNA سلول متصل شده و آن را ترمیم می‌کند، بطوریکه سلول‌های *دینوکوکوس رادیودورانس* زنده باقی می‌مانند و بنابراین این پروتئین نقش حیاتی برای سلول‌های اشعه دیده‌شده دارد (**۲۰**). نتایج این مطالعه و سایر مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که پروتئین PprI می‌تواند سبب حفاظت‌بخشی در میزبان‌های پروکاریوتی علیه اشعه ماورای بنفش شود؛ بنابراین می‌توان با تولید این پروتئین به‌صورت نوترکیب در مقیاس بالا در سیستم‌های یوکاریوتی میزان حفاظت‌بخشی آن را علیه اشعه UV به‌طور موضعی مورد بررسی قرارداد و به‌عنوان یک ترکیب ضد - اشعه مورداستفاده قرار گیرد. درنهایت پیشنهاد می‌شود با روش‌های ژنومیکس و پروتئومیکس مکانیسم مولکولی مقاومت به پرتو در باکتری *دینوکوکوس رادیودورانس* و سایر باکتری‌های مقاوم به پرتو موردمطالعه قرار گیرد تا بتوان پروتئین‌های جدید مقاوم به اشعه‌ی یونیزان را شناسایی نمود و نوع نوترکیب آنها را به‌صورت ترکیبی با پروتئین *PprI* مورد استفاده قرارداد تا بتوان میزان حفاظت‌بخشی را تا حد بسیار زیادی افزایش داد.

تشکر و قدردانی

بدین ترتیب از آقایان سید حمیدرضا خاتمی و رامین فلاح زاده که در اجرای این پروژه همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Rainey FA, Ray K, Ferreira M, Gatz BZ, Nobre MF, Bagaley D, et al. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. Applied and Environmental Microbiology. 2005; 71(9):5225-35.
2. Singh OV, Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. 2011; 110(4):851-861.
3. Asker D, Awad TS, Beppu T, Ueda K. *Deinococcus aquiradiocola* sp. nov. isolated from a radioactive site in Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009; 59:144-9.
4. Michael C, Keck JL, Battista JR. Rising from the Ashes: DNA Repair in *Deinococcus radiodurans*. PLoS Genet. 2010; 6(1): e1000815.
5. Daly MJ. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. Nature Reviews Microbiology. 2009; 496(7):237–245.
6. Singh O.V, Gabani P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. Journal of Applied Microbiology. 2011; 110(4): 851–861.
7. Daly, M. J. Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Venkateswaran A et al. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. Science. 2004; 306:1025–1028.

8. Dea S, Miroslav R. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011; 75(1):133-91
9. Tour CB, Toueille M, Jolivet E, Nguyen HH, Servant P, Vannier F, Sommer S. The *Deinococcus radiodurans* SMC protein isdispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. Extremophiles. 2009; 13:827–837.
10. Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee DY, et al. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. PLoS One. 2010; 5(9):e12570.
11. Yuejin H, Issay N,Guanjun G, Bing T,Katsuya S,Shigeru K, Binghui S. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003; 306:354–360.
12. Lu H, Chen H, Xu G, Shah AM, Hua Y. DNA binding is essential for PprI function in response to radiation damage in *Deinococcus radiodurans*. DNA Repair. 2012; 11: 139– 145.
13. Krisko A, Radman M. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2013; 1; 5(7).
14. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1, Science. 1999; 286; 1571–1577.
15. Gao G, Le D, Huang L, Lu H, Narumi I, Hua Y. Internal promoter characterization and expression of the *Deinococcus radiodurans* pprI-folP gene cluster. FEMS Microbiology Letters. 2006 Apr; 257(2):195-201.
16. Earl AM, Mohundro MM, Mian IS, Battista JR. The IrrE protein of *Deinococcus* radiodurans R1 is a novel regulator of recA expression. Journal of Bacteriology. 2002; 184(22):6216–6224.
17. Kobayashi Y, Narumi I, Satoh K, Funayama T, Kikuchi M, Kitayama S, Watanabe H. Radiation response mechanisms of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Biological sciences in space. 2004; 18(3):134–135.
18. Gao G, Tian B, Liu L, Sheng D, Shen B, Hua Y. Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*. DNA Repair (Amst). 2003; 2(12):1419-27.
19. Pan J, Wang J, Zhou Z, Yan Y, Zhang W, Lu W, et al. IrrE, a Global Regulator of Extreme Radiation Resistancein *Deinococcus radiodurans*, Enhances Salt Tolerance in Escherichia coli and *Brassica napus*. 2009; PLoS ONE 4(2): e4422.
20. Guanjun G, Huiming L, Lifen H. Construction of DNA damage response gene *pprI* function-deficient and function-com-plementary mutants in *Deinococcus radiodurans.* Chinese Science Bulletin. 2005; 50 (4): 311-31.